

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FERNANDA GAENSLY

**INCORPORAÇÃO DE FERRO PELA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* E
SUA INFLUÊNCIA NA FORMAÇÃO DE BIOMASSA E NA CAPACIDADE
FERMENTATIVA**

**CURITIBA
2010**

FERNANDA GAENSLY

**INCORPORAÇÃO DE FERRO PELA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* E
SUA INFLUÊNCIA NA FORMAÇÃO DE BIOMASSA E NA CAPACIDADE
FERMENTATIVA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientação: Prof^a. Dr^a. Tania M. B. Bonfim
Co-orientação: Prof^a. Dr^a. Debora Brand

**CURITIBA
2010**

Gaensly, Fernanda

Incorporação de ferro pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* e sua influência na formação de biomassa e na capacidade fermentativa / Fernanda Gaensly – Curitiba, 2010.

77 f.: il.; 31 cm.

Orientadora: Tania Maria Bordin Bonfim

Co-orientadora: Debora Brand

Dissertação (Mestrado) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração: Insumos, Medicamentos e Correlatos.

Inclui bibliografia

1. *Saccharomyces cerevisiae*. 2. Incorporação de ferro. 3. Levedura de panificação. 4. Capacidade fermentativa. 5. Tecnologia de bioprocessos. I. Bonfim, Tania Maria Bordin. II. Brand, Debora. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 664.024

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Paraná pela oportunidade de uma graduação e pós-graduação com qualidade.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e aos seus professores que contribuíram para minha formação acadêmica.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Tania Maria Bordin Bonfim, pela confiança, inspiração no amadurecimento dos meus conhecimentos, dedicação ao trabalho e pelo aprendizado nestes dois anos de mestrado.

À minha co-orientadora Prof^a. Dr^a Debora Brand, por auxiliar na viabilização deste trabalho.

À CAPES, pela bolsa de mestrado.

À Especialização em Microbiologia Aplicada pelo apoio financeiro que viabilizou a aquisição de equipamentos e reagentes para a realização dos experimentos.

Ao Prof. Dr. Alessandro Nogueira, pelas suas contribuições na correção e avaliação desta dissertação.

Ao Prof. Dr. Geraldo Picheth, pelo auxílio nas análises estatísticas e pelas suas contribuições na correção e avaliação desta dissertação.

À Prof. Dra. Grace Wille pelo auxílio na elaboração dos pães.

Ao Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos (CEPPA) da Universidade Federal do Paraná pela realização das análises de ferro por espectrometria de absorção atômica.

Aos professores Dr. Cid Aimbiré de Moraes Santos e Dr^a. Mayumi Elisa Otsuka Sato pela amizade, incentivo na área da pesquisa e pela participação na minha formação quanto à extensão, iniciação científica e pós-graduação.

Aos colegas do laboratório de Enzimologia e Tecnologia das Fermentações Priscila Silva, Rodrigo Cordeiro, Gisele Leitão, Flávia Fernandes Luiz, Daniel Braga de Lima e Bruna Agustini, pelo auxílio em análises e pesquisas, pelas discussões científicas e que, muito mais que colegas, tornaram-se grandes amigos e pudemos dividir bons momentos de convivência.

Aos meus amigos do curso do Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Adélia Grzybowski, Cláudia Seidl, Marcela Tiboni e Mário Piantavini, por tornarem todos os momentos mais fáceis e divertidos.

Às minhas amigas Caroline Prochaska, Consuelo Fortes, Fernanda Smolarek, Fernanda Voos, Mariana Rigotto e Nathalia Iensen, pelos momentos de descontração e risadas.

Aos meus pais, Rosane e Carlos, pela educação, valores ensinados e por sempre me incentivarem a estudar.

Ao meu marido, Felipe Gomide, pelo incentivo, ajuda, amor e carinho.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

“Science never solves a problem without creating ten more”

George Bernard Shaw

RESUMO

O ferro consiste em um micronutriente essencial para o metabolismo dos organismos, entretanto, sua deficiência é observada principalmente em mulheres com idade fértil e em crianças. Sais de ferro suplementados à dieta possuem baixa biodisponibilidade e podem causar desconfortos gastrointestinais. Leveduras enriquecidas com ferro podem ser um veículo para a suplementação deste mineral à dieta, pois a ligação do ferro com macromoléculas presentes nas células da levedura torna este mineral biodisponível. O presente trabalho avaliou o emprego de sulfato ferroso, sulfato férrico, cloreto ferroso, cloreto férrico, nitrato férrico, citrato férrico e EDTA férrico para suplementar o cultivo em frascos da levedura de panificação *Saccharomyces cerevisiae*. A quantificação do ferro absorvido pela levedura foi avaliada por colorimetria. A concentração de biomassa obtida nos cultivos suplementados com 15 mg Fe l⁻¹ e 25 mg Fe l⁻¹ empregando sulfato ferroso, cloreto ferroso, citrato férrico, EDTA férrico e sem suplementação de ferro foram semelhantes. O meio com sulfato ferroso 100 mg Fe l⁻¹ permitiu maior acúmulo de ferro intracelular, em torno de 5,43 mg Fe g⁻¹ célula seca, após 20 horas de cultivo. Avaliando-se as características morfológicas microscópicas das células, foi observada a presença moderada ou intensa de pseudo-hifas nos cultivos suplementados com os sais cloreto férrico e cloreto ferroso nas concentrações de 15 mg Fe l⁻¹ e 25 mg Fe l⁻¹ e em todos os cultivos com concentrações de ferro igual ou acima de 50 mg Fe l⁻¹. Os valores de produtividade em biomassa e em produto mostraram que o melhor desempenho da levedura de panificação *Saccharomyces cerevisiae* tanto no que se refere ao crescimento celular quanto na incorporação de ferro ocorreu quando se empregou o meio YM 1% suplementado com 100 mg Fe l⁻¹ utilizando o sulfato ferroso. O cultivo da levedura de panificação *Saccharomyces cerevisiae* em reator empregando meio YM 1% suplementado com 100 mg Fe l⁻¹ utilizando o sulfato ferroso obteve biomassa com cerca de 8 mg Fe g⁻¹ de célula seca, que manteve sua capacidade fermentativa no que se refere ao deslocamento de água pela produção de gás carbônico ou pelo seu emprego em panificação. O pão produzido com a levedura obtida por cultivo em meio YM 1% suplementado com 100 mg Fe l⁻¹ obteve 6 vezes mais ferro que o pão produzido com a levedura cultivada em meio YM 1% sem suplementação de ferro.

palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*. Incorporação de ferro. Levedura de panificação. Capacidade fermentativa.

ABSTRACT

Iron is an essential micronutrient to organism metabolism, however, its deficiency is well documented especially in pregnant women and in children. Iron salts supplemented to the diet have low bioavailability and can cause gastrointestinal discomforts. Iron enriched yeasts can provide a supplementation of this micronutrient to the diet because this mineral has a better bioavailability when bounded to yeast cells macromolecules. This work studied the use of ferrous sulfate, ferric sulfate, ferrous chloride, ferric chloride, ferric nitrate, ferric citrate and ferric EDTA to supplement flasks cultures of baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In order to quantify the absorbed iron by the yeast, colorimetric evaluation was applied. Biomass formation in cultivation supplemented with 15 mg Fe l⁻¹ or 25 mg Fe l⁻¹ employing ferrous sulfate, ferrous chloride, ferric citrate, ferric EDTA and without supplementation was similar. The media with ferrous sulfate 100 mg Fe l⁻¹ allowed the better intracellular iron accumulation, around 5,43 mg Fe g⁻¹ dry matter, after 20 hours of cultivation. When the microscopic morphological characteristics of the cells were evaluated, it was observed a moderate or intense pseudohyphae presence in cultivations supplemented with ferric chloride or ferrous chloride 15 mg Fe l⁻¹ or 25 mg Fe l⁻¹ and in all cultivations which iron concentration applied was equal or superior to 50 mg Fe l⁻¹. Biomass productivity and product productivity values showed that the best performance of baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* for cellular growth as well as for iron uptake took place when Yeast Media (YM) 1% supplemented with 100 mg Fe l⁻¹ of ferrous sulfate was used. Baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* was cultivated in reactor employing YM 1% supplemented with 100 mg Fe l⁻¹ using ferrous sulfate and the resultant biomass had around 8 mg Fe g⁻¹ dry matter. This biomass kept its fermentative power regarding both water displace measurement thought carbonic dioxide production as well as its bakery characteristics. The bread produced using the yeast obtained by cultivation in YM 1% supplemented with 100 mg Fe l⁻¹ presented 6 times more iron than the bread produced using the yeast obtained by cultivation in YM 1% without iron supplementation.

key-words: *Saccharomyces cerevisiae*. Iron uptake. Baker's yeast. Fermentation power.

LISTA DE GRÁFICOS E FIGURAS

FIGURA 1 - ESTRUTURA MOLECULAR DO GRUPO HEME	14
FIGURA 2 - ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA MOLÉCULA DE HEMOGLOBINA	15
FIGURA 3 - ABSORÇÃO E METABOLISMO DO FERRO.....	16
FIGURA 4 - PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA ABSORÇÃO DO FERRO HEME E DO FERRO INORGÂNICO.....	18
FIGURA 5 - LEVEDURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20
FIGURA 6 - ORGANELAS E COMPARTIMENTOS DE UMA CÉLULA DE LEVEDURA.....	21
FIGURA 7 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO METABOLISMO DA LEVEDURA EM CONDIÇÕES AERÓBICA E ANAERÓBICA.....	24
FIGURA 8 - ABSORÇÃO DE FERRO PELA MEMBRANA PLASMÁTICA DAS LEVEDURAS	32
FIGURA 9 - EQUIPAMENTO PARA A MEDIDA DO DESLOCAMENTO DE ÁGUA A PARTIR DA PRODUÇÃO DE GÁS CARBÔNICO PELAS CÉLULAS DA LEVEDURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	45
FIGURA 10 - VARIAÇÃO NA CONCENTRAÇÃO DE FERRO (mg g^{-1} célula seca) INCORPORADO PELA LEVEDURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i> E FORMAÇÃO DE BIOMASSA (g%) APÓS 20 HORAS DE CULTIVO EM MEIO YM 1% SUPLEMENTADO COM SULFATO FERROSO	48
FIGURA 11 - VARIAÇÃO NA CONCENTRAÇÃO DE FERRO (mg g^{-1} célula seca) INCORPORADO PELA LEVEDURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i> E FORMAÇÃO DE BIOMASSA (g%) APÓS 20 HORAS DE CULTIVO EM MEIO YM 1% SUPLEMENTADO COM DIFERENTES SAIS DE FERRO	50
FIGURA 12 - COMPARAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR, CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCAR REDUTOR RESIDUAL E INCORPORAÇÃO DE FERRO PELA LEVEDURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i> APÓS 20 HORAS DE CULTIVO EM MEIO YM 1% SEM E COM SUPLEMENTAÇÃO DE 50 E 100 mg Fe l^{-1} DE SULFATO FERROSO	53
FIGURA 13 - COMPARAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR, CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCAR REDUTOR RESIDUAL E INCORPORAÇÃO DE FERRO PELA LEVEDURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i> APÓS 20 HORAS DE CULTIVO EM MEIO YM 1% SEM E COM SUPLEMENTAÇÃO DE 200 mg Fe l^{-1} DE CITRATO FÉRRICO	55
FIGURA 14 - VARIAÇÃO DO pH EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CULTIVO DA LEVEDURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i> EM MEIO YM SUPLEMENTADO COM 100 mg Fe l^{-1} DE SULFATO FERROSO EMPREGANDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NUTRIENTES	57

FIGURA 15 - VARIAÇÃO NA CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCAR REDUTOR EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CULTIVO DA LEVEDURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i> EM MEIO YM SUPLEMENTADO COM 100 mg Fe l ⁻¹ DE SULFATO FERROSO EMPREGANDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NUTRIENTES.....	58
FIGURA 16 - FORMAÇÃO DE BIOMASSA EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CULTIVO DA LEVEDURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i> EM MEIO YM SUPLEMENTADO COM 100 mg Fe l ⁻¹ DE SULFATO FERROSO EMPREGANDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NUTRIENTES	59
FIGURA 17 - VARIAÇÃO NA CONCENTRAÇÃO DE FERRO INTRACELULAR EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CULTIVO DA LEVEDURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i> EM MEIO YM SUPLEMENTADO COM 100 mg Fe l ⁻¹ DE SULFATO FERROSO EMPREGANDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NUTRIENTES.....	60
FIGURA 18 - CONCENTRAÇÃO DE FERRO RESIDUAL NOS MEIOS YM 1%, 2%, 4% E 6% SUPLEMENTADO COM 100 mg Fe l ⁻¹ DE SULFATO FERROSO DURANTE O CULTIVO DA LEVEDURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	62
FIGURA 19 - VISUALIZAÇÃO DO CULTIVO DA LEVEDURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i> SUPLEMENTADO COM CLORETO FERROSO 25 mg Fe l ⁻¹	66
FIGURA 20 - VISUALIZAÇÃO DO CULTIVO DA LEVEDURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i> SUPLEMENTADO COM EDTA FÉRRICO 15 mg Fe l ⁻¹	66
FIGURA 21 - AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE FERMENTATIVA DA LEVEDURA DE PANIFICAÇÃO.....	70

LISTA DE QUADROS E TABELAS

TABELA 1 - MINERAIS PRESENTES EM CÉLULAS DE LEVEDURA.....	26
TABELA 2 - RELAÇÃO DE REAGENTES	34
TABELA 3 - IDENTIFICAÇÃO DO FERMENTO BIOLÓGICO ADQUIRIDO NO COMÉRCIO DA CIDADE DE CURITIBA - PR	35
TABELA 4 - CONCENTRAÇÃO DOS COMPONENTES (g l^{-1}) EMPREGADAS NOS MEIOS YM 1%, YM 2%, YM 4% E YM 6%	35
TABELA 5 - VALORES DE PRODUTIVIDADE EM BIOMASSA ($\text{g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$) DA LEVEDURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CULTIVADA NOS MEIOS YM 1%, 2%, 4% E 6% SUPLEMENTADOS COM 100 mg Fe l^{-1}	63
TABELA 6 - VALORES DE PRODUTIVIDADE DE PRODUTO ($\text{mg Fe g}^{-1} \text{ célula}$ seca h^{-1}) DA LEVEDURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CULTIVADA NOS MEIOS YM 1%, 2%, 4% E 6% SUPLEMENTADOS COM 100 mg Fe l^{-1}	63
TABELA 7 - CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DE CULTIVOS REALIZADOS EMPREGANDO MEIO YM 1% SEM E COM SUPLEMENTAÇÃO DE DIFERENTES SAIS DE FERRO	65

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS	11
2.1 OBJETIVO PRINCIPAL	11
2.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS	11
3 REVISÃO DE LITERATURA	12
3.1 FERRO	12
3.2 METABOLISMO DO FERRO EM HUMANOS	13
3.3 LEVEDURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20
3.4 INCORPORAÇÃO DE METAIS EM CÉLULAS DE LEVEDURAS	27
3.5 LEVEDURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i> E O FERRO	30
4 MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1 REAGENTES	34
4.2 MICRO-ORGANISMO	35
4.3 MEIOS DE CULTIVO	35
4.3.1 Meio <i>Yeast Medium</i>	35
4.3.2 Meio YM suplementado com diferentes sais de ferro	36
4.4 OBTENÇÃO DA CEPA PURA DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	37
4.5 CONSERVAÇÃO DO MICRO-ORGANISMO	37
4.6 CULTIVOS	38
4.6.1 Preparo do inóculo	38
4.6.2 Cultivo em frascos	38
4.6.3 Cultivo em reator	39
4.7 AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS MICROSCÓPICAS	40
4.8 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR	40
4.8.1 Determinação do número de células totais ml^{-1}	40
4.8.2 Método gravimétrico	40
4.9 DETERMINAÇÃO DE pH	41
4.10 QUANTIFICAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES	41
4.11 QUANTIFICAÇÃO DE FERRO	42
4.11.1 Colorimetria	42
4.11.2 Espectrometria de absorção atômica	43
4.12 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DO CULTIVO	43
4.12.1 Produtividade em biomassa	43
4.12.2 Produtividade em produto	44
4.13 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE FERMENTATIVA	44
4.13.1 Medida do volume de água deslocado com a formação de gás carbônico	44
4.13.2 Elaboração de pães	45
4.14 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	46
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1 OBTENÇÃO DA CEPA PURA DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	47
5.2 CULTIVO EM FRASCOS	47
5.3 AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS MICROSCÓPICAS	64

5.4 CULTIVO EM REATOR	68
5.5 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE FERMENTATIVA.....	69
6 CONCLUSÕES.....	72
REFERÊNCIAS.....	73
ANEXOS	78

1 INTRODUÇÃO

Existe grande interesse no entendimento das funções fisiológicas de micronutrientes ou micro-elementos em micro-organismos e em organismos superiores sob diferentes pontos de vista, como bioquímico, medicinal e nutricional (MRVCIC *et al.*, 2007). Existem publicações que abordam as patologias associadas ao excesso, falta ou alteração da correta proporção de micronutrientes na dieta (COZZOLINO, 2005).

Alguns estudos descrevem que vários compostos inorgânicos utilizados para a suplementação de micronutrientes encontram-se pouco biodisponíveis, sendo que alguns compostos, dependendo da dose utilizada, podem apresentar efeitos adversos (MRVCIC *et al.*, 2007; PAS *et al.*, 2007).

Paralelamente, de forma experimental, pesquisadores relatam que micronutrientes organicamente ligados possuem uma biodisponibilidade superior e são melhores absorvidos no trato digestório de humanos e de outros animais superiores (DAVIS *et al.*, 2008). Além disso, micronutrientes em sua forma orgânica apresentam menor toxicidade (LETAVAYOVA *et al.*, 2008).

A formação de quelatos estáveis e neutros protege os micronutrientes das reações químicas que ocorrem durante o processo digestivo, garantindo sua solubilidade no decorrer do trato gastrointestinal até o local de absorção (GLIGIC, PALIC e NIKOLOVSKI, 2004).

Um dos processos utilizados para a produção de micronutrientes ligados a substratos orgânicos consiste em cultivar células de leveduras em meio suplementado com micronutrientes, pois em determinadas situações físico-químicas as leveduras são capazes de formar ligações orgânicas com diferentes minerais, acumulando-os intracelularmente em concentrações acima do normal (MRVCIC *et al.*, 2007).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* representa um suplemento alimentar valioso, pois enriquece com proteínas e vitaminas a dieta humana. Esta levedura é muito usada em pesquisas de micro-elementos em micro-organismos, devido ao fato de ser facilmente cultivável e à possibilidade de se obter uma elevada biomassa em tempos relativamente curtos de cultivo (MRVCIC *et al.*, 2007).

O ferro é um dos micronutrientes cujo metabolismo está bem caracterizado, pois ele está relacionado a inúmeras atividades essenciais para o funcionamento do organismo, além de ser importante na composição de diversas moléculas, como ferritina, hemoglobina, entre outras (COZZOLINO, 2005).

No organismo humano, o ferro é pouco absorvido, principalmente se a dieta for pobre em ácido ascórbico e baseada somente em vegetais. A carência de ferro consiste na deficiência nutricional mais comum no mundo – considerada um problema de saúde pública – principalmente entre crianças e em mulheres em idade fértil (PHILPOTT e PROTCHENKO, 2008). Atualmente, a anemia causada pela deficiência deste micronutriente é a doença de maior prevalência, atingindo de dois a três bilhões de indivíduos em todo o mundo (COZZOLINO, 2005)

Estudos compilados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) / *World Health Organization* (WHO) que relacionam o estado nutricional e a ocorrência de anemia revelam que o Brasil possui incidência desta doença principalmente em crianças recém nascidas e em idade escolar, e em gestantes (WHO, 2007).

A biomassa de levedura, quando enriquecida com ferro, pode representar uma solução mais segura para a prevenção da anemia. Além disso, o ferro, quando ligado a carreadores orgânicos, como diferentes macromoléculas encontradas nas células de leveduras, possui melhor absorção e mostra-se menos tóxico (PAS *et al.*, 2007)

O uso da levedura enriquecida com ferro em panificação é uma fonte ainda não estudada para a suplementação de ferro na dieta. Pesquisas realizadas buscam identificar as concentrações nas quais o ferro não é tóxico para as leveduras, e em quais condições estas apresentam um crescimento ótimo. Existem muitas formas de leveduras enriquecidas com ferro no mercado (*Yeast Iron – ScienceLab®*; *Herbal Iron Yeast Free – Natureworks®*), mas os processos de produção de biomassa são considerados propriedade industrial, e não são publicados pelas empresas. Não foram encontradas publicações até a finalização deste trabalho referentes à levedura de panificação, enriquecida com ferro, que mantenha sua capacidade fermentativa. O presente trabalho procura avaliar diferentes sais de ferro e meios de cultivo para a incorporação de ferro pela levedura de panificação *Saccharomyces cerevisiae*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Cultivar a levedura de panificação *Saccharomyces cerevisiae* visando a formação de biomassa, incorporação de ferro e a manutenção da sua capacidade fermentativa.

2.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

Cultivar a levedura de panificação *Saccharomyces cerevisiae* em meios com diferentes concentrações sem e com adição de ferro utilizando sulfato ferroso, sulfato férrico, cloreto ferroso, cloreto férrico, nitrato férrico, citrato férrico e EDTA férrico.

Verificar a morfologia das células crescidas em cultivos sem e com suplementação de ferro.

Avaliar os parâmetros cinéticos de produtividade em biomassa e de produtividade em produto dos cultivos.

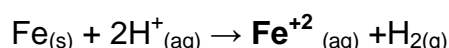
Avaliar a capacidade fermentativa da levedura de panificação *Saccharomyces cerevisiae* obtida de cultivos sem e com adição de ferro.

3 REVISÃO DE LITERATURA

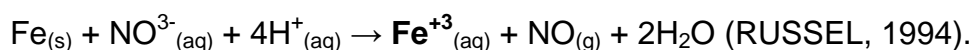
3.1 FERRO

O ferro é o segundo metal e o quarto elemento mais abundante na crosta terrestre. Em seus compostos, o ferro, cujos elétrons de valência encontram-se na camada d^6 , mostra em geral os números de oxidação +2 e +3. O íon de ferro (II) ou íon ferroso, Fe^{+2} , de cor verde pálida, existe como um complexo octaédrico em água. Quando tratado com base, precipita na forma de hidróxido ferroso, $Fe(OH)_2$, um precipitado branco quando puro, mas que aparece quase sempre verde claro, devido à existência de um intermediário da oxidação do hidróxido ferroso a hidróxido férrico, $Fe(OH)_3$, pelo oxigênio molecular (O_2). O íon ferroso é oxidado muito lentamente a íon férrico (Fe^{+3}), mesmo em solução ácida. O íon de ferro III, ou íon férrico, é incolor em água, embora as soluções de sais férricos geralmente demonstrem uma coloração amarela ou amarela acastanhada devido à hidrólise, que forma complexos $Fe(OH)^{+2}$ e $Fe(OH)_2^{+1}$. A adição de base ao íon férrico precipita uma substância gelatinosa de cor vermelha amarronzada, o hidróxido férrico. Este é menos solúvel que o hidróxido ferroso e não é anfótero (REILLY, 1991; RUSSEL, 1994).

O ferro dissolve-se em ácidos não oxidantes tais como ácido clorídrico e ácido sulfúrico diluído, para formar ferro II ou íon ferroso:



O ácido nítrico diluído oxida o ferro ao estado +3 (íon férrico):



O sulfato ferroso é solúvel em água, e sua solução aquosa é oxidada pelo ar, sendo que esta oxidação é acelerada com o aumento de temperatura, adição de álcali, ou exposição à luz. É utilizado como suplemento alimentar, mas sua ingestão em quantidades superiores a 200 mg Fe dia^{-1} , principalmente em crianças, pode causar vômito, dano hepático, taquicardia e colapso vascular periférico. (MARTINDALE e REYNOLDS, 1989; BUDAVARI, 1996).

O sulfato férrico é um sal higroscópico, sendo que os produtos comerciais contêm aproximadamente 20% de água. É lentamente solúvel em água (BUDAVARI, 1996).

O cloreto ferroso é livremente solúvel em água, possui as formas diidratada e tetraidratada, as quais também são solúveis em água, mas podem não solubilizarem-se completamente em pH básico (BUDAVARI, 1996).

O cloreto férrico é usado em soluções para suplementação mineral, sendo que estas soluções contêm de 15 a 60% do sal (MARTINDALE e REYNOLDS, 1989; BUDAVARI, 1996).

O nitrato férrico é mais presente na sua forma nonoidratada, sendo esta livremente solúvel em água, álcool e acetona. É usado como fixador de pigmentos e como agente colorimétrico em química analítica (BUDAVARI, 1996).

O citrato férrico é uma combinação de ferro e ácido cítrico em composição indefinida. É lenta, mas completamente, solúvel em água fria, e rapidamente solúvel em água quente, sendo que esta solubilidade diminui com o passar do tempo. É usado para tratamento de deficiência de ferro em animais (MARTINDALE e REYNOLDS, 1989; BUDAVARI, 1996).

O etilenodiaminicotetraacético (EDTA) férrico é obtido pela combinação de ácido etilenodiaminotetracético dissódico com nitrato férrico e é utilizado como fonte de ferro (BUDAVARI, 1996).

3.2 METABOLISMO DO FERRO EM HUMANOS

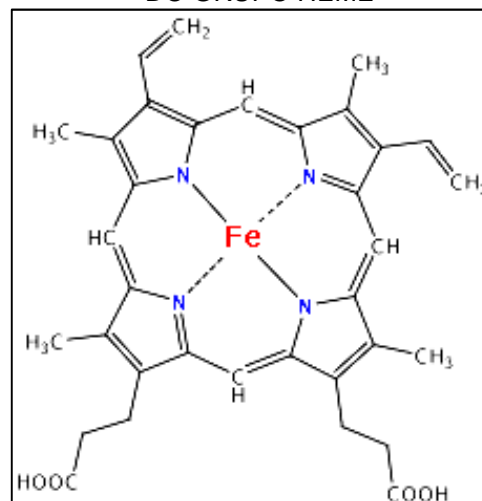
O organismo humano, assim como outros organismos no decorrer da sua evolução, desenvolveu vias metabólicas dependentes do ferro que são essenciais para a sobrevivência. Apenas um grupo de organismos parece não possuir enzimas dependentes de ferro em seu metabolismo, as bactérias anaeróbias ácido lácticas (REILLY, 1991).

O ferro possui inúmeras funções no organismo. Ele atua como carreador de oxigênio dos pulmões para os tecidos através da hemoglobina, como um transportador de elétrons nas células e como parte integrante de sistemas enzimáticos em vários tecidos (WHO, 2004). Juntamente com enzimas e outros

nutrientes, o ferro melhora a oxigenação de todos os processos orgânicos (PALLAORO, 1998).

Grande quantidade do ferro presente no organismo encontra-se nos eritrócitos, ligado à hemoglobina. A hemoglobina consiste em uma molécula composta de quatro unidades, cada uma delas contendo um grupo heme (Figura 1) e uma cadeia de proteína. O grupo heme é essencial para todas as células aeróbicas, sendo sua função o transporte de oxigênio e elétrons. A estrutura do grupo heme é composta pelo átomo de ferro unido a quatro anéis pirrólicos de protoporfirina por átomos de nitrogênio (DA SILVA e HASHIMOTO, 1999).

FIGURA 1 - ESTRUTURA MOLECULAR DO GRUPO HEME



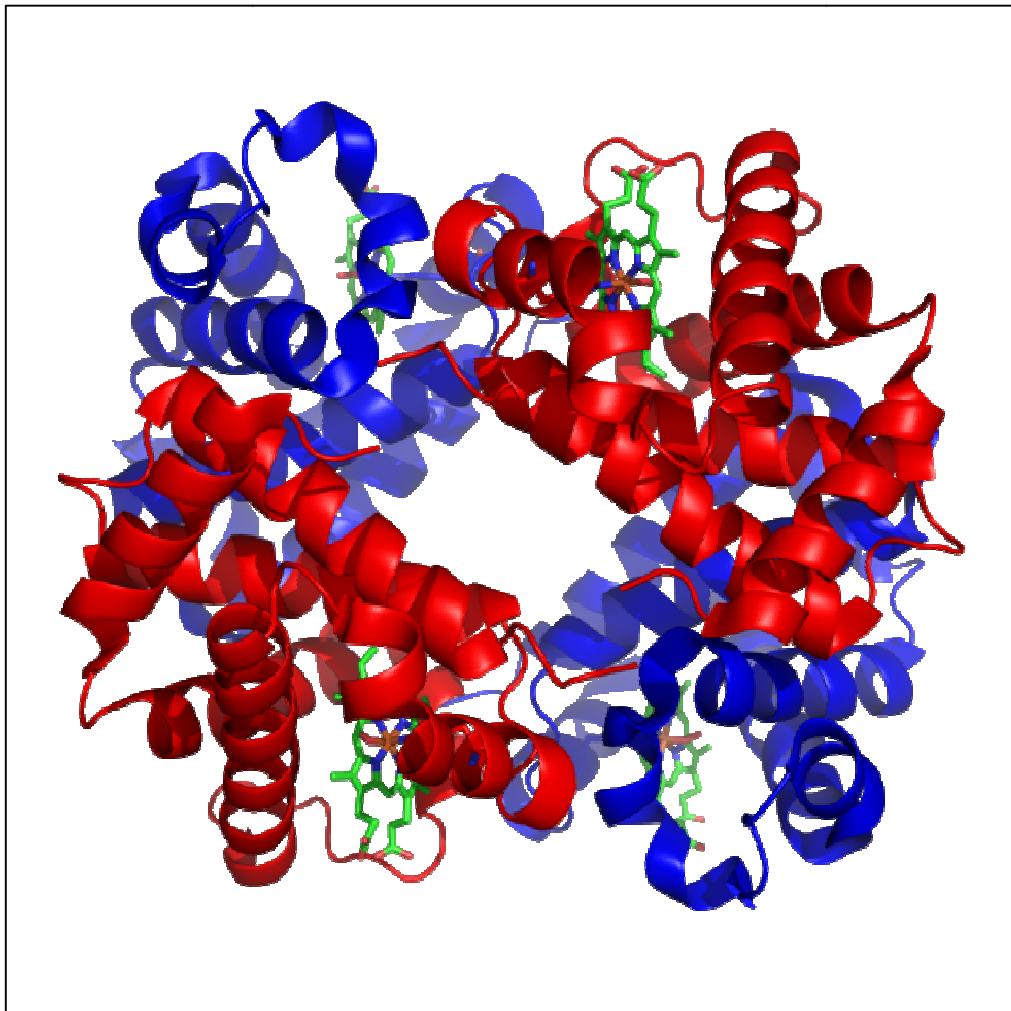
O grupo heme consiste em um íon ferro contido em um anel heterocíclico, denominado porfirina. O anel porfirínico consiste de quatro moléculas de pirrol ciclizadas contendo o íon ferro no centro deste anel. O íon ferro, local de ligação com o oxigênio, coordena-se com os quatro átomos de nitrogênio presentes no centro do anel.

FONTE: ZAMORA, 2006

A estrutura da hemoglobina (Figura 2) permite que ela esteja completamente oxigenada nos pulmões e praticamente sem oxigênio nos tecidos. A mioglobina, uma proteína que armazena o oxigênio no tecido muscular também possui ferro, mas diferentemente da hemoglobina, possui apenas uma unidade heme e uma cadeia de globina. Várias enzimas que contém ferro – os citocromos – também

possuem um grupo heme e uma cadeia de globina. Estas enzimas atuam como carreadores de elétrons nas células, mas sua estrutura não permite a liberação e captação reversível de oxigênio. No metabolismo oxidativo, transferem energia pela célula, particularmente para a mitocôndria. Outras funções das enzimas que contém ferro incluem a síntese de hormônios esteróides e de ácidos biliares, desintoxicação de substâncias no fígado e mediação de sinais em alguns neurotransmissores, como a dopamina e a serotonina (WHO, 2004).

FIGURA 2 - ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA MOLÉCULA DE HEMOGLOBINA



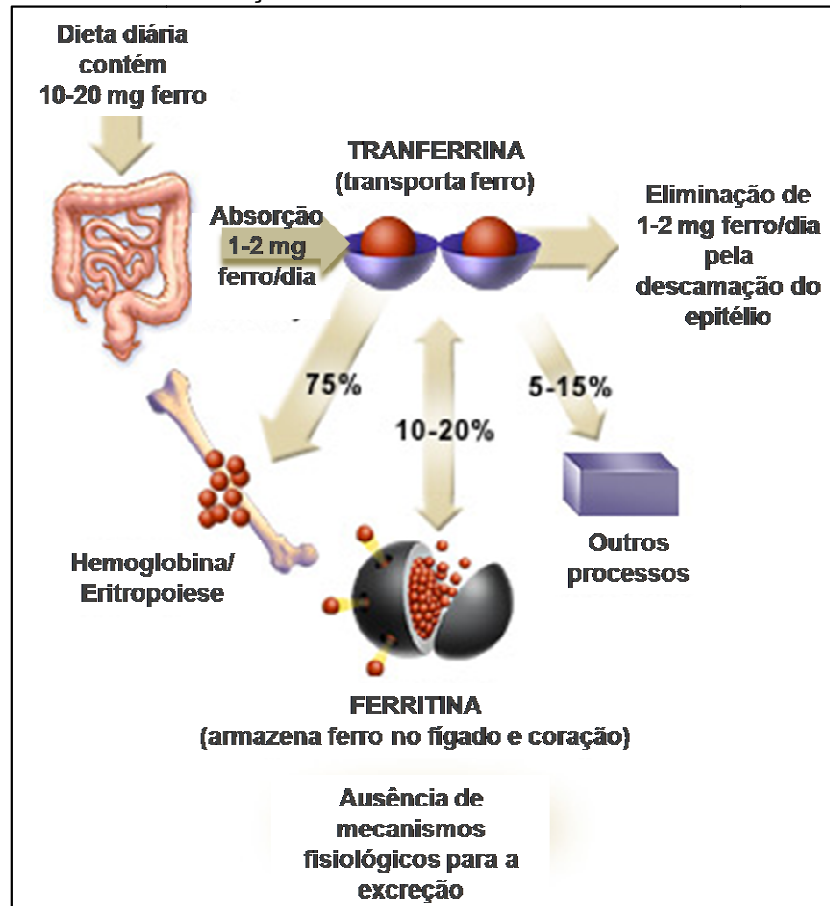
As subunidades de globina estão representadas em azul e vermelho, o grupo heme está representado em verde.

FONTE: WHEELER, 2007

No organismo humano, o ferro é armazenado em proteínas como a ferritina e a hemosiderina. A ferritina é solúvel em água e está presente no plasma, já a

hemossiderina não é solúvel em água, sendo encontrada entre as células. O ferro é transportado entre diferentes compartimentos do organismo pela proteína transferrina (Figura 3) (WHO, 2004; CHANG *et al.*, 2005).

FIGURA 3 - ABSORÇÃO E METABOLISMO DO FERRO.



O ferro é ligado e transportado no organismo pela proteína ferritina.
 FONTE: Adaptado de CDC, 2010

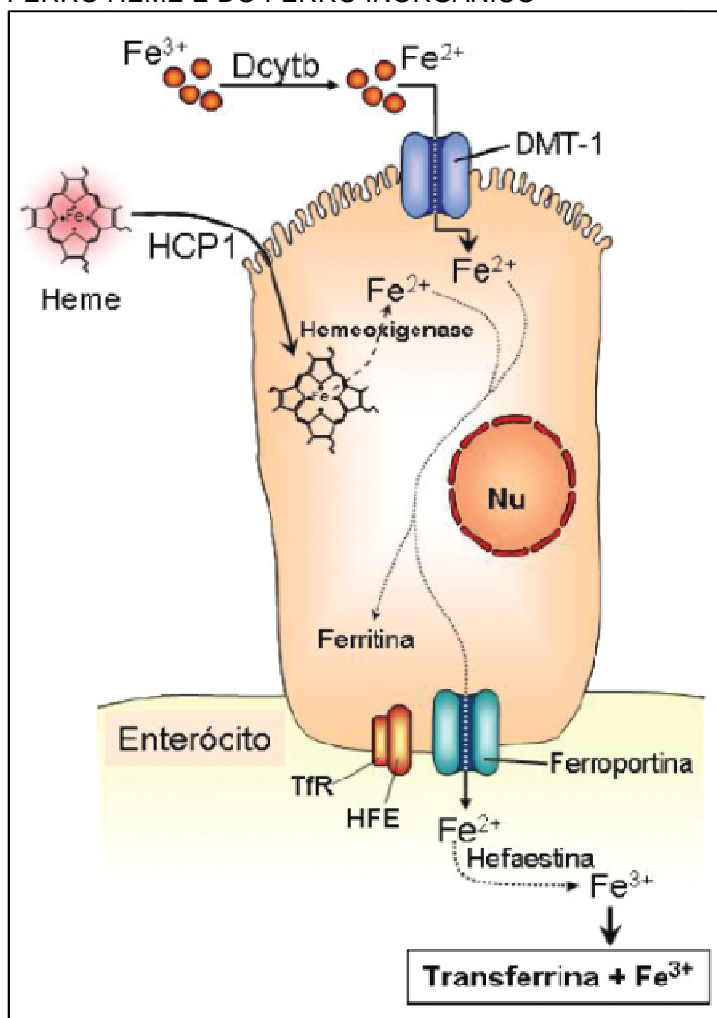
Os recém nascidos possuem uma quantidade de ferro de aproximadamente 250-300 mg (75 mg kg^{-1}). Durante os primeiros dois meses de vida, a concentração de hemoglobina decresce devido à melhoria da oxigenação, quando comparada a vida intra-uterina do feto. Isto leva a uma redistribuição considerável do ferro dos eritrócitos para os locais de armazenamento nos ossos. Este ferro irá suprir as necessidades da criança durante os primeiros seis meses de vida, pois o leite materno contém pouca quantidade de ferro. Após os seis meses de idade, as necessidades diárias de ferro aumentam para aproximadamente $9,3 \text{ mg dia}^{-1}$. Esta necessidade diária é bem elevada, principalmente levando-se em conta a relação entre o tamanho da criança e o consumo de energia necessário. Durante o primeiro

ano de vida, a criança praticamente dobra a quantidade de ferro em seu organismo, e até os seis anos de idade esta quantidade irá duplicar novamente. Desta forma, as necessidades de absorção de ferro por crianças são extremamente altas, comparando-se com suas necessidades energéticas diárias. É possível conseguir absorver a quantidade de ferro recomendada nesta idade com uma dieta rica em carnes e alimentos ricos em ácido ascórbico. Por isto, diversos países fortificam cereais com ferro e ácido ascórbico, pois este tipo de alimento está muito presente na dieta das crianças, e também devido à importância do ferro durante o período de desenvolvimento cerebral. As necessidades de ferro também aumentam durante a adolescência, principalmente durante o período de crescimento mais pronunciado (WHO, 2004).

O ferro é um dos minerais mais difíceis de ser absorvido e armazenado, e é facilmente excretado (PALLAORO, 1998). A biodisponibilidade de um nutriente ingerido pode ser definida como sua acessibilidade aos processos metabólicos e fisiológicos normais. A biodisponibilidade influencia o efeito benéfico de um nutriente em níveis fisiológicos de ingestão, mas também pode afetar a natureza e a gravidade da toxicidade quando a ingestão for excessiva (COZZOLINO, 2007).

Considerando-se o mecanismo de absorção de ferro, existem dois tipos de ferro na dieta: ferro heme e ferro não-heme. O ferro heme é incorporado ao organismo pelo consumo de carnes, aves e peixes, e seu principal destino é a formação de hemoglobina e mioglobina. A média de absorção do ferro heme em refeições contendo carnes é em torno de 25%. Esta absorção pode chegar a 40% em períodos em que o organismo está deficiente de ferro, e em 10% quando há excesso de ferro no organismo. O ferro não-heme é encontrado em cereais, legumes, frutas e vegetais, sendo este o de maior presença na dieta. A absorção de ferro não-heme é influenciada pela presença de ferro no organismo e por diversos fatores da dieta, pois ele precisa formar complexos com cobre, ácido fólico, vitamina B6 e ácido ascórbico. Qualquer deficiência destes nutrientes pode prejudicar a absorção do ferro. Compostos de ferro usados na fortificação de alimentos estão apenas em parte disponíveis para absorção. Substâncias redutoras – para que o ferro esteja na forma ferrosa – devem estar presentes para que o ferro possa ser absorvido (Figura 4) (PALLAORO, 1998; WHO, 2004).

FIGURA 4 - PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA ABORÇÃO DO FERRO HEME E DO FERRO INORGÂNICO



Dcytb: ferredutase; DMT-1: transportador de metal divalente-1; HCP-1: proteína transportadora do heme-1; Nu: núcleo; HFE: proteína da hemocromatose; Tfr: receptor da transferrina.

FONTE: GROTO, 2008

A escolha da fonte de ferro para fortificar um produto alimentício, deve considerar também a influência do ferro nas propriedades organolépticas do produto, principalmente quando se utiliza ferro heme. A solubilidade dos compostos de ferro está inversamente relacionada à sua vida útil. Quanto mais solúvel o composto, maior sua reatividade química, portanto maior o risco de oxidação. O sulfato ferroso é instável, apesar de ser o composto inorgânico de ferro de maior biodisponibilidade e menor custo. Outros compostos de ferro insolúveis, como ferro reduzido e fosfato ferroso, são mais estáveis, mas a absorção de ferro é baixa, particularmente se ingeridos com alimentos (COZZOLINO, 2005; COCATO *et al.*, 2007).

A deficiência de ferro é um tipo bem caracterizado de desnutrição. Ela ocorre quando a disponibilidade do ferro é insuficiente para os precursores dos eritrócitos. Apesar de todos os esforços mundiais, a falta de ferro é a deficiência nutricional de um único micronutriente que mais prevalece mundialmente. A deficiência na ingestão de ferro pode diminuir sua quantidade no organismo, e, em casos mais severos, levar à anemia. Existem pesquisas científicas para desenvolver novas e melhores preparações antianêmicas (STEHLIK-THOMAS *et al.*, 2003; CHANG *et al.*, 2005; PAS *et al.*, 2007)

A anemia é o resultado de uma insuficiência de hemoglobina na circulação, provocando diminuição da habilidade de transporte de oxigênio para os tecidos. Os sinais clínicos da anemia incluem capacidade de trabalho diminuída, apatia, cansaço persistente, respiração curta, palpitações, dores de cabeça, tontura e irritabilidade. Entre as causas da anemia, a principal é a deficiência em ferro, que pode ocorrer tanto pela falta de ingestão quanto pelo aumento da excreção. A anemia é definida como a concentração de hemoglobina no sangue total abaixo de 85% da média para uma determinada faixa etária da população. A deficiência de ferro atinge proporção significativa de mulheres na idade fértil. Levando-se em conta a concentração de hemoglobina, a anemia atinge cerca de 15% das mulheres em idade fértil nos países desenvolvidos e cerca de 30% de gestantes (COZZOLINO, 2005).

No Brasil estudos evidenciaram índices de prevalência de anemia variando de 22 a 80% em crianças menores de 5 anos de idade. A ingestão de ferro nas dietas é limítrofe em relação às recomendações, somada a biodisponibilidade que é baixa, devido a fatores inibidores. As dietas dos indivíduos de baixa renda são ainda mais prejudicadas pela pouca ingestão de carnes (COZZOLINO, 2005; WHO, 2007).

A recomendação da ingestão diária de ferro no Brasil, no momento da conclusão deste documento, está regulamentada pela Resolução RDC nº 269 de 22 de setembro de 2005. A ingestão diária recomendada de ferro para adultos é de 14 mg, a ingestão diária para lactentes até 6 meses é de 0,27 mg e até 11 meses de 9 mg. Crianças até 6 anos devem ingerir diariamente 6 mg, e até 10 anos 9 mg de ferro. Para gestantes e lactantes as recomendações de ingestão diária são de 27 mg e 15 mg respectivamente. Estes valores consideram a biodisponibilidade de ferro nos alimentos em torno de 10% (BRASIL, 2005).

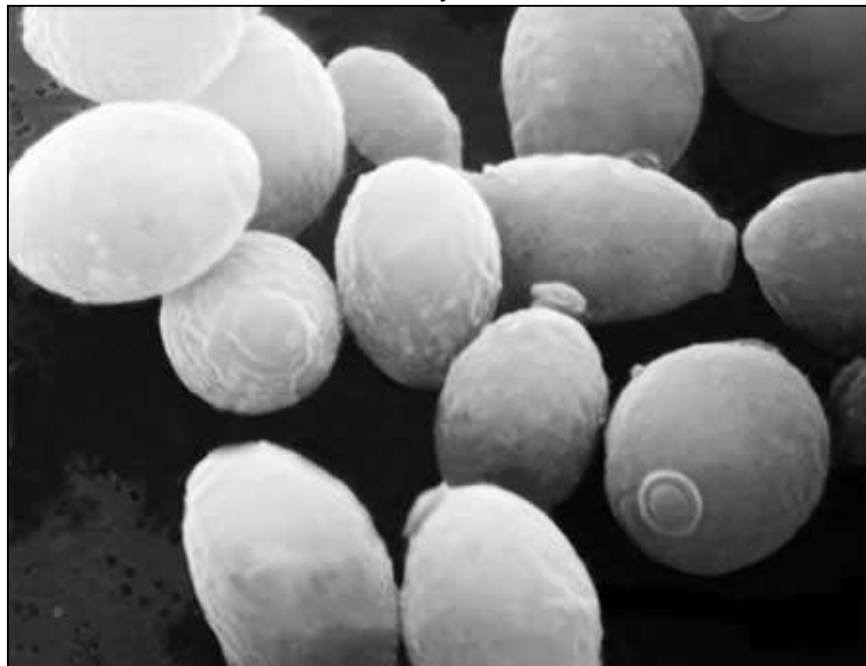
Além da prevenção da anemia, a importância do ferro está bem reconhecida no que se refere ao funcionamento central do sistema de crescimento somático e

desenvolvimento neurofisiológico. Em gestantes, a deficiência de ferro pode estar associada a partos prematuros e ao nascimento de bebês com peso abaixo da média. A deficiência de ferro também se mostra um fator de susceptibilidade a infecções (CHANG *et al.*, 2005).

3.3 LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae*

As leveduras (Figura 5) são o mais importante grupo de micro-organismos comercialmente explorados pelo homem do ponto de vista econômico. Produtos industriais derivados de leveduras, como o etanol (usado na indústria de bebidas, solventes, produtos químicos e combustíveis) e a biomassa de leveduras (usada nas indústrias farmacêutica e alimentícia) tornaram-se populares mundialmente. As leveduras também são de grande auxílio para se compreender os processos genéticos, bioquímicos e metabólicos básicos em organismos vivos (JOSHI e PANDEY, 1999).

FIGURA 5 - LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae*



FONTE: ARMAND-FRAPIER, 2010

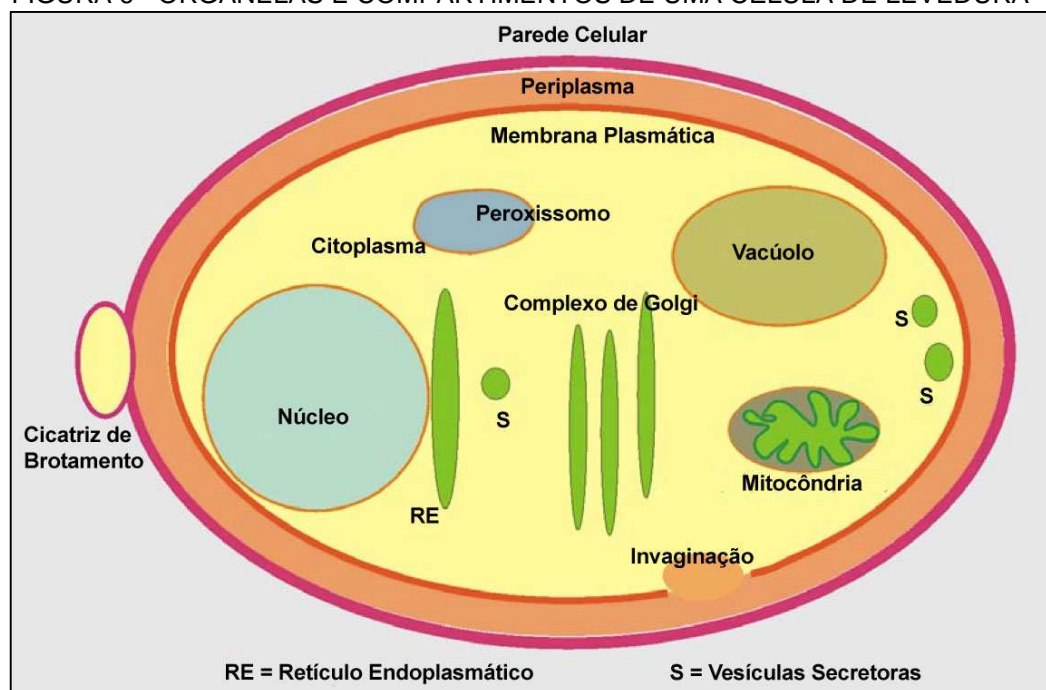
No campo da biologia molecular experimental, as leveduras foram os primeiros organismos eucariontes a terem o seu genoma completamente mapeado (FELDMANN, 2005).

Entretanto, o conhecimento limitado no que se refere aos determinantes genéticos e fisiológicos das leveduras sugerem um sistema complexo de controle regulatório envolvendo múltiplos genes (WINDE, 2003).

As leveduras são formas de fungos unicelulares, possuem parede celular e um núcleo por célula. Podem ser classificadas entre diversos grupos metabólicos, dependendo da sua utilização da respiração ou fermentação para a formação de ATP (GRIFFIN, 1994).

A composição do meio de cultivo em relação aos açúcares e oxigênio disponível são as duas condições ambientais que impactam na fisiologia metabólica das leveduras (ROSA e GÁBOR, 2006).

FIGURA 6 - ORGANELAS E COMPARTIMENTOS DE UMA CÉLULA DE LEVEDURA



Desenho esquemático de organelas e compartimentos em uma célula de levedura.
 FONTE: Adaptado de FELDMANN, 2005

Em uma levedura pode-se observar as seguintes estruturas celulares: parede celular, periplasma, membrana plasmática, invaginação da membrana, cicatriz de

brotamento, citoplasma, núcleo, mitocôndria, retículo endoplasmático, sistema de Golgi, vesículas secretoras, vacúolo, peroxissomo (Figura 6). As leveduras compartilham a maioria das estruturas e atividades funcionais correspondentes com as células de organismos superiores, por este motivo, as leveduras são um bom modelo para o estudo biológico de células eucarióticas. As diferenças encontradas entre as células de leveduras e células de organismos superiores compreendem a parede celular rígida e a presença de cicatrizes de brotamento, devido à divisão celular. Nas células de organismos superiores os vacúolos, presentes nas leveduras, correspondem aos lisossomos (FELDMANN, 2005).

As células da *Saccharomyces cerevisiae* possuem geralmente formato elipsóide, sendo que o maior diâmetro das células varia entre 5 e 10 μm e o menor diâmetro varia entre 1 a 7 μm . A média dos volumes celulares é de 29 ou 55 μm^3 para as células haplóides e diplóides, respectivamente, e o tamanho celular aumenta de acordo com a maturação da célula (FELDMANN, 2005).

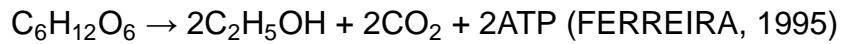
A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que conhecidamente divide-se por brotamento, foi descrita por Emil Hansen, no século 19, como sendo capaz de formar um véu quando observada macroscopicamente, sugerindo crescimento filamentoso. Poucas observações do crescimento em pseudo-hifa desta levedura foram realizadas até o ano de 1992, provavelmente devido ao fato de que cepas habitualmente encontradas em laboratório não apresentam esta característica (KRON, 1997).

As colônias de *Saccharomyces cerevisiae* são de coloração branca ou creme, de aspecto cremoso, possuem reprodução vegetativa por brotamento e podem possuir pseudo-hifas simples; possuem ascos persistentes contendo quatro ou mais ascósporos, redondos ou ovais (BARNETT, PAYNE e YARROW, 2000).

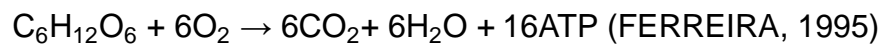
A manutenção de condições aeróbias no cultivo não é suficiente para que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* alcance o metabolismo respiratório. Mesmo culturas aeróbicas exibem um metabolismo misto, respiratório e fermentativo, a menos que sejam cultivadas em meio com concentração limitada de açúcar e com lenta taxa de crescimento (BAKKER *et al.*, 2000).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* cresce em glucose segundo três importantes vias metabólicas, dependendo das condições do cultivo. Na presença de alta concentração de glucose, ou ausência de oxigênio, a glucose é fermentada pela via redutiva, com produção de etanol e dióxido de carbono (FERREIRA, 1995).

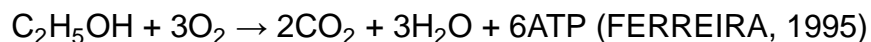
A conversão estequiométrica da glucose em etanol (fermentação da glucose) é traduzida pela seguinte equação:



A oxidação da glucose é a via predominante em culturas aeróbias para concentrações de glucose inferiores a 100 mg l^{-1} . Esta via oxidativa, apresenta a seguinte estequiometria:



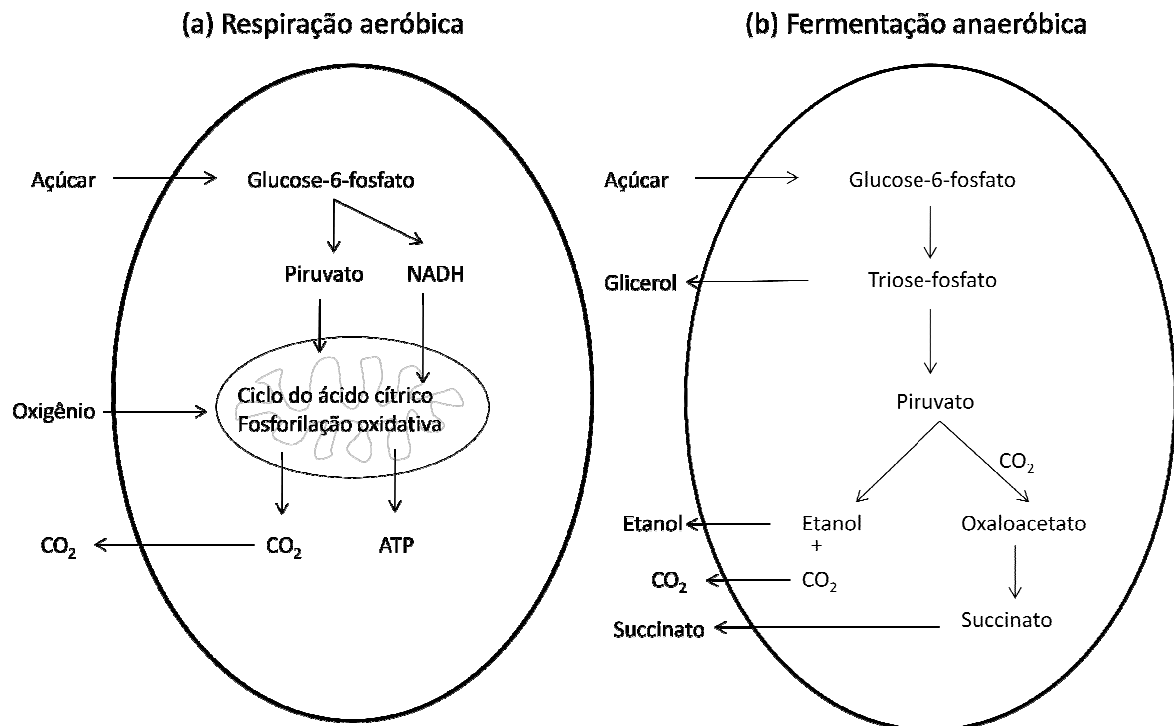
O etanol formado pela via fermentativa pode ser consumido pela via oxidativa na presença de baixas concentrações de glucose. A via de oxidação do etanol tem a seguinte estequiometria:



Para concentrações de glucose superiores a 100 mg l^{-1} as vias respiratória e fermentativa da glucose podem ocorrer em paralelo (FERREIRA, 1995).

Em reatores em que seja difícil manter condições homogêneas poderá ocorrer a produção de etanol por algumas células e a utilização deste por outras células, implicando uma correspondente redução do rendimento (FERREIRA, 1995).

FIGURA 7 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO METABOLISMO DA LEVEDURA EM CONDIÇÕES AERÓBICA E ANAERÓBICA



A principal fonte para a produção de energia pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* é a glucose e a glicólise é a via mais utilizada para a conversão de glucose em piruvato, onde a produção de energia ocorre na forma de moléculas de ATP juntamente com a formação de intermediários redutores como o NADH. Os dois principais modelos para o uso do piruvato para produção de energia podem ser divididos em respiração e fermentação. **(a) Respiração aeróbica:** na presença de oxigênio e na ausência de repressores, o piruvato entra na matriz mitocondrial onde será descarboxilado a acetil CoA pelo complexo enzimático piruvato desidrogenase. Esta reação conecta a glicólise ao ciclo do ácido cítrico, do qual o acetil CoA é completamente oxidado formando duas moléculas de gás carbônico. **(b) Fermentação anaeróbica:** durante a fermentação anaeróbica dos açúcares, a levedura re-oxida NADH para NAD em uma reação de duas etapas a partir do piruvato. A enzima piruvato quinase é responsável pela reação de conversão do fosfoenolpiruvato em piruvato, que também resulta na formação de ATP.

FONTE: FELDMANN, 2005

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é a espécie geralmente usada em fermentações, produção de cerveja, panificação e também como proteína unicelular. A *Saccharomyces cerevisiae* não é apenas usada para obtenção de proteína, mas também como fonte de enzimas, vitaminas, flavorizantes e como agente de fermentação (JOSHI e PANDEY, 1999).

Uma boa atividade fermentativa das leveduras de panificação é um critério muito importante para ser considerado no preparo de pães. A levedura de panificação necessita possuir um bom rendimento de crescimento em condições aeróbicas e preservar a sua capacidade de adaptar-se em condições anaeróbicas de crescimento durante a fermentação de massa de pão (JOSHI e PANDEY, 1999).

Os produtos de panificação e seus derivados possuem como ingredientes básicos farinha de cereal, água, levedura de panificação e sal. Ingredientes opcionais podem ser adicionados para melhorar o processamento, ou produzir especialidades e novos pães, os quais geralmente possuem valores nutricionais elevados. Durante os processos de panificação, a disponibilidade e o nível de compostos bioativos presentes nos grãos, podem apresentar decréscimo ou acréscimo. O conhecimento científico pode ser aplicado para o desenvolvimento de novos processos produtivos de fermentos para produtos comerciais (DEWETTINCK *et al.*, 2008).

Os cereais contém cerca de 1,5 a 2,5% de minerais. O mineral de maior concentração nos cereais (16 a 22% do conteúdo de cinzas totais) é o fósforo, o qual encontra-se geralmente associado com fitatos de cálcio e magnésio. Trigo, centeio, cevada e aveia são classificados como fontes moderadas de cálcio (100 a 200 mg 100 g⁻¹), magnésio (100 a 200 mg 100 g⁻¹), ferro (1 a 5 mg 100 g⁻¹), zinco (1 a 5 mg 100 g⁻¹) e cobre (0,1 a 1 mg 100 g⁻¹). Além destes, outros elementos também estão presentes em menores quantidades (DEWETTINCK *et al.*, 2008).

Os grãos são importantes fontes de minerais, mas também contém ácido fítico, o qual é conhecido como sendo um fator anti-nutricional. O ácido fítico possui grande atividade quelante, o que pode reduzir a biodisponibilidade de alguns minerais. Mulheres de países industrializados, principalmente as mulheres em idade fértil, possuem baixo nível de ferro e relativamente alta prevalência de anemia decorrente da deficiência de ferro (DEWETTINCK *et al.*, 2008). Kristensen e colaboradores (2005) relatam que dietas ricas em fibras e grãos integrais, podem resultar em redução da biodisponibilidade de ferro não-heme, principalmente devido ao aumento da ingestão de ácido fítico (KRISTENSEN *et al.*, 2005).

O mercado de leveduras de panificação está em crescente busca por novos processos e produtos, podendo incorporar avanços biotecnológicos. O segmento de produtos nutracêuticos é o que mais cresce na indústria alimentícia. O pão, como um produto de consumo diário, mostra-se muito provável para tornar-se um alimento funcional. Desta forma, para agregar valor aos seus produtos, o mercado de alimentos provavelmente utilizaria uma levedura de panificação que produzisse precursores de vitaminas, ácidos graxos essenciais ou prebióticos (WINDE, 2003).

Células de leveduras inativadas e derivados (células rompidas mecanicamente e concentrados protéicos) são usados como complementos

nutricionais e como ingredientes para a formulação de uma variedade de alimentos industrializados (YAMADA e SGARBIERI, 2005). Em um estudo da composição de células de leveduras e propriedades nutricionais, Yamada e Sgarbieri (2005) determinaram a quantidade de elementos minerais em células de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* obtidas de indústria de destilaria. Sgarbieri e colaboradores (1999) determinaram a composição mineral do autolisado total de levedura *Saccharomyces sp.* provenientes de cervejarias (Tabela 1).

TABELA 1 - MINERAIS PRESENTES EM CÉLULAS DE LEVEDURA

Elemento	LEVEDURAS OBTIDAS DE DESTILARIA	LEVEDURAS OBTIDAS DE CERVEJARIAS
	mg 100 g célula seca ⁻¹	
Sódio	6,3 ± 0,3	605,0 ± 10,0
Cálcio	147,7 ± 1,4	412,6 ± 12,0
Magnésio	143,5 ± 0,3	161,8 ± 2,5
Fósforo	1516,0 ± 20,0	1178,5 ± 19,5
Potássio	2035,0 ± 5,0	1365,5 ± 31,5
Ferro	38,0 ± 0,7	10,0 ± 0,1
Manganês	1,4 ± 0,01	3,7 ± 0,07
Zinco	12,7 ± 0,1	4,0 ± 0,3
Cobre	4,9 ± 0,03	0,6 ± 0,03
Cobalto	-	0,3 ± 0,01
Cromo	-	0,3 ± 0,04

Composição mineral do autolisado total de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* obtidas de indústrias de destilaria (YAMADA e SGARBIERI, 2005) e de cervejarias (SGARBIERI *et al.*, 1999).

FONTE: SGARBIERI *et al.*, 1999; YAMADA e SGARBIERI, 2005

A comparação dos teores encontrados pelos autores com os índices recomendados de ingestão diária, mencionados na página 19, mostra que, com exceção fósforo, potássio, ferro, manganês, cobalto e cromo, os derivados de levedura não devem ser considerados fontes de minerais, e a ingestão desses produtos deve ser limitada a cerca de 30 g dia⁻¹, em virtude do elevado teor de ácido nucléico (SGARBIERI *et al.*, 1999).

A concentração de ferro requerida pelas leveduras, em condições fisiológicas normais, é relativamente baixa, entre 1 a 10 µmol. Entretanto o conteúdo de ferro intracelular pode ser diferente, dependendo dos fatores ambientais (VARGA e MARÁZ, 2002).

3.4 INCORPORAÇÃO DE METAIS EM CÉLULAS DE LEVEDURAS

O enriquecimento de leveduras com metais é conseguido a partir da inclusão de um sal inorgânico do metal desejado ao meio de cultivo, seguido de um tratamento térmico para inibir o crescimento das leveduras e as atividades enzimáticas. O metal é incorporado à célula da levedura por vários mecanismos, entre eles, a produção de proteínas ligadas a metal (como metalotioninas), mineralização e sequestro nos vacúolos (SHOEIB e MESTER, 2007).

A absorção de metais por fungos é um processo que ocorre por dois passos, um independente do metabolismo e outro dependente do metabolismo do organismo (DOSTALEK, PATZAK e MATEJKA, 2004).

O acúmulo de metais nas leveduras envolve a combinação de acúmulo extracelular dos metais e de mecanismos de transportes. O primeiro estágio, denominado bioissorção, refere-se às ligações passivas e é o estágio inicial do acúmulo, sendo rápido e reversível. A estabilidade dos cátions metálicos ligados à superfície das células depende do pH e da presença de cátions competidores ou ligantes orgânicos que possam formar complexos. O segundo estágio, ou o transporte ativo, é um processo lento de bioacumulação, o qual é geralmente irreversível e está relacionado com as atividades metabólicas das células (VARGA e MARÁZ, 2002).

Em determinadas situações físico-químicas as leveduras são capazes de formar ligações orgânicas com diferentes minerais, acumulando-os em concentrações acima do normal (MRVCIC *et al.*, 2007). Para a incorporação de selênio, por exemplo, Suhajda e colaboradores (2000) perceberam que os parâmetros de controle mais importantes são o pH e o nível de oxigenação durante o cultivo (SUHAJDA *et al.*, 2000).

As células de leveduras captam os metais com dupla valência em sua superfície (bioissorção) devido tanto à presença de fosfomananas em sua parede celular como também devido à presença de proteínas de superfície com grupos carboxila, hidroxila, amino, fosfato e hidrossulfato livres. O maior nível da bioissorção de microelementos ocorre geralmente no primeiro período do cultivo da biomassa, após o qual se observa uma ligação lenta dos microelementos às estruturas intracelulares (bioacumulação) (MRVCIC *et al.*, 2007).

Devido a esta propriedade de incorporar os metais intercelularmente, a biomassa de levedura está cada vez mais sendo utilizada como um veículo para suplementos minerais. A biodisponibilidade, atividade desejada e toxicidade destes suplementos serão resultado da concentração do metal, seu estado de oxidação, e da forma química de seus complexos formados (SHOEIB e MESTER, 2007).

Estudos realizados com leveduras cultivadas em meio suplementado com selênio mostram que o selenito de sódio, ao ser adicionado ao meio de cultivo, é biotransformado em selenometionina (STABNIKOVA *et al.*, 2008).

Esta transformação do metal, quando incorporado a uma molécula orgânica, muitas vezes torna o metal mais eficientemente absorvido pelo organismo. Os metais ligados a moléculas orgânicas possuem uma atividade biológica superior, e são geralmente menos tóxicos em elevadas concentrações quando comparados com os respectivos sais inorgânicos (MRVCIC *et al.*, 2007; SHOEIB e MESTER, 2007).

Entre as fontes de selênio orgânico mais economicamente viável estão leveduras crescidas em meio enriquecido com selênio. Yin e colaboradores (2009) avaliaram meios complexos obtidos a partir de arroz, beterraba e soja, para a incorporação de selênio nas células, melhorando a taxa de conversão do substrato em biomassa bem como a taxa de conversão de selênio inorgânico em orgânico (YIN *et al.*, 2009).

Muitos estudos que se referem à caracterização das espécies de metais biotransformadas com o enriquecimento de leveduras estão dirigidos ao selênio. Recentemente estudos similares realizados por cromatografia de exclusão e espectrometria de massa foram reportados para melhor caracterizar as espécies orgânicas transformadas por leveduras suplementadas com crômio, zinco, cobre e iodo (SHOEIB e MESTER, 2007).

Alguns trabalhos já relatam estudos referentes ao enriquecimento de biomassa de leveduras com ferro.

Em 1999, Kazuhiro e Junichi perceberam a dificuldade em se formular um meio de cultivo para produzir leveduras contendo ferro intracelular de modo a evitar a presença de precipitados no meio de cultivo. Os autores desenvolveram um processo caracterizado por cultivar as leveduras em meio contendo magnésio e adicionar o ferro gradualmente ao meio de cultivo. Os autores conseguiram adicionar

2000 ppm de ferro no meio de cultivo, produzindo leveduras com ferro intracelular. (KAZUHIRO e JUNICHI, 1999).

Em 2006, Shusuke e colaboradores descreveram um meio de cultivo para a produção de levedura contendo ferro em alta concentração caracterizado pelo uso de valores de pH abaixo de 2,5 para assegurar a solubilidade de sais de ferro (SHUSUKE, TOSHINOBU e FUNIHIDE, 2006).

A distribuição celular de microelementos em células de *Saccharomyces cerevisiae* enriquecidas com cromo, ferro, selênio e zinco determinou que uma porção de 68% a 88% dos microelementos provavelmente estão ligados a moléculas orgânicas, como proteínas e carboidratos (VARGA e MARÁZ, 2002).

Avaliando a possibilidade de obter-se complexo orgânico de Fe^{2+} com a suplementação de cloreto de ferro na produção de biomassa de leveduras e na produção de etanol, a concentração de $0,8 \text{ g l}^{-1}$ de cloreto de ferro adicionada ao meio provocou aumento na biomassa de levedura em 21% e a produção de etanol em 16% (STEHLIK-THOMAS *et al.*, 2003).

O desenvolvimento de uma cepa mutante de *Saccharomyces cerevisiae* promoveu o acúmulo de 25 mg Fe g^{-1} de levedura seca quando esta foi cultivada em meio enriquecido com $1,6 \text{ g l}^{-1}$ de sulfato ferroso (YUAN *et al.*, 2004).

Estudou-se o acúmulo de ferro em cepas de *Saccharomyces cerevisiae* variando-se o sal de ferro utilizado para suplementar o meio (citrato de ferro, nitrato de ferro, cloreto de ferro e EDTA férrico) em diferentes concentrações. Após a determinação da melhor fonte de ferro para o cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*, esta mesma fonte foi empregada para o enriquecimento de cepas de *Candida intermedia* e *Kluyveromyces marxianus*, mostrando que estas leveduras podem ser utilizadas em estudos futuros para a suplementação alimentar de ferro orgânico (PAS *et al.*, 2007).

Em estudo dos efeitos espécie-específicos da suplementação alimentar de ferro em cultivo de aves, utilizando sulfato ferroso 6 mg Fe g^{-1} em ração como controle e levedura inativa enriquecida com ferro na concentração equivalente a 6 mg Fe g^{-1} como hipótese na ração das aves, a população suplementada com a levedura contendo ferro obteve contagens superiores de eritrócitos e hemoglobina e o ganho de peso nesta população foi significativamente superior (GLIGIC, PALIC e NIKOLOVSKI, 2004).

3.5 LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* E O FERRO

Assim como para outros organismos, o ferro é um nutriente essencial para as leveduras, mas também pode ser potencialmente tóxico nestas células. Por este motivo, a incorporação e utilização do ferro pelas leveduras são bem reguladas. A obtenção de metais por micro-organismos é complexa e dependente da química do íon metálico, propriedades específicas de superfície do micro-organismo, fisiologia da célula e influências físico-químicas do meio de cultivo (PAS *et al.*, 2007).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* pode facilmente desenvolver-se em meios de cultura nos quais o ferro esteja muito escasso ou muito abundante, e também pode sobreviver às flutuações da disponibilidade de ferro no meio. As células de levedura também conseguem crescer em meio isento de ferro por várias gerações, indicando que elas expressam mecanismos eficientes de armazenamento e mobilização de ferro (PHILPOTT e PROTCHENKO, 2008).

Estudando-se a resposta transcricional à falta de ferro no meio de cultivo, sugere-se que as células de levedura respondem a esta ausência alterando a utilização deste micronutriente, retirando o ferro de vias metabólicas não essenciais e preservando-o em vias essenciais. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* pode metabolizar os produtos da glicólise tanto pela via respiratória como pela via fermentativa, entretanto, cepas cultivadas em meio pobre de ferro, ou cepas em que os sistemas de transporte de ferro estão ausentes, mostram deficiência respiratória e não conseguem desenvolver-se em meios com fontes não fermentáveis de carbono (PHILPOTT e PROTCHENKO, 2008).

O ferro, em meio aquoso e aeróbico, caracteriza-se por ser um metabólito instável e citotóxico. O ferro é encontrado no seu estado férrico (Fe^{3+}), o qual sofre uma série de reações de hidrólise – série de ionizações dos prótons da água – formando espécies de hidróxidos ou sais que são termodinamicamente insolúveis e cineticamente inertes, sendo, nestas formas, biologicamente inacessível por mecanismos simples (STEHLIK-THOMAS *et al.*, 2003; KWOK *et al.*, 2006; PHILPOTT e PROTCHENKO, 2008).

O ferro no seu estado ferroso (Fe^{+2}), apesar de relativamente solúvel, sofre reação de auto-oxidação com o oxigênio molecular, que resulta em espécies de

oxigênio reativas: radical superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxil (KWOK *et al.*, 2006).

Desta forma, o metabolismo do ferro visa proteger o Fe^{+3} da hidrólise e controlar a atividade de oxido-redução do Fe^{+2} . Ambas as espécies de ferro (Fe^{+2} e Fe^{+3}) estão presentes no metabolismo de alta afinidade de absorção de ferro da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (KWOK *et al.*, 2006).

A concentração de íons férricos disponíveis em uma solução de pH neutro é de aproximadamente 10^{-18} M, muito abaixo da afinidade dos sistemas de transporte conhecidos. Desta forma, antes do ferro poder ser transportado através da membrana celular, sua solubilidade precisa ser aumentada. Organismos contornam este problema por dois meios: secreção de substâncias quelantes e redução do íon férrico (ASKWITH, DE SILVA e KAPLAN, 1996).

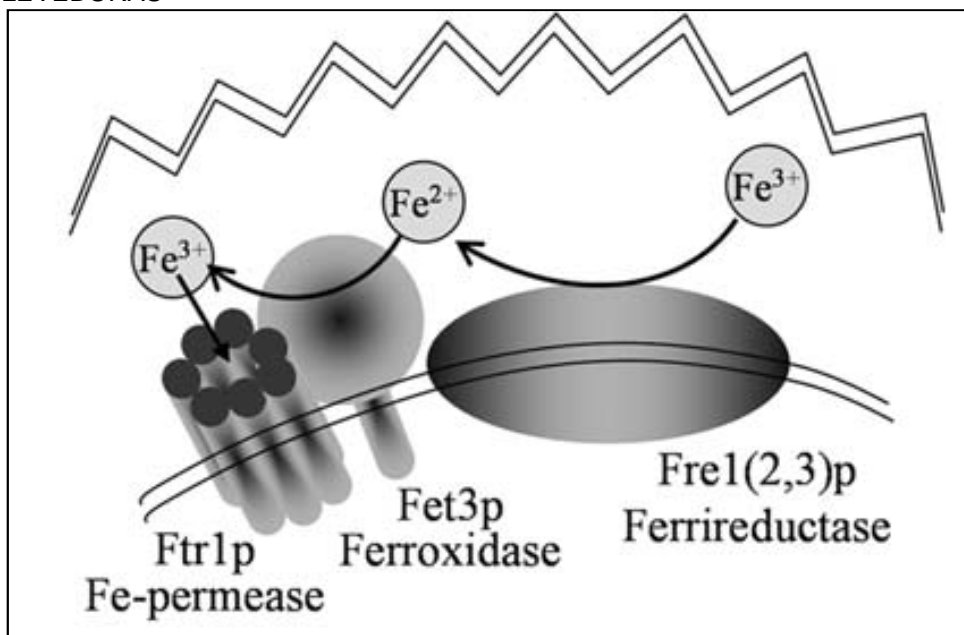
A levedura *Saccharomyces cerevisiae* expressa dois sistemas genéticos para a absorção de ferro, denominados de sistema redutor e sistema não-redutor. Sais férricos ou quelatos férricos são substratos para o sistema redutor, enquanto que o sistema não-redutor reconhece exclusivamente quelatos de ferro em sideróforos (PHILPOTT e PROTCHENKO, 2008). Sideróforos são moléculas de baixa massa molecular sintetizados por bactérias, fungos e plantas. Os sideróforos quelam o Fe^{+3} tornando este íon disponível para redução ou transporte para o interior das células (SCHRODER, JOHNSON e DE VRIES, 2003).

A absorção pela redução do ferro é um processo constituído por duas etapas. A concentração intracelular de ferro é regulada primeiramente por uma proteína da membrana plasmática transportadora de ferro. Em resposta à deficiência de ferro, a enzima redutase férrica (proteína Fre1) é ativada na membrana plasmática, reduzindo Fe^{3+} a Fe^{2+} , o que aumenta a solubilidade do ferro. A enzima redutase férrica é codificada pelos genes FRE1 e FRE2 (STEHLIK-THOMAS *et al.*, 2003; KWOK *et al.*, 2006; PHILPOTT e PROTCHENKO, 2008)

O íon ferroso (Fe^{+2}) – gerado pela redutase férrica – é substrato para o componente Fet3p do complexo de absorção de ferro. Este componente realiza juntamente a oxidação de quatro íons Fe^{+2} e a redução de oxigênio molecular a água. O Fe^{+3} produzido é substrato ligante para o componente ferro-permease da proteína Ftr1p (Figura 4). O ferro transportado para o interior da célula de leveduras através deste transportador de alta afinidade é regulado pela concentração

intercelular de ferro, sendo específico por este íon (STEHLIK-THOMAS *et al.*, 2003; KWOK *et al.*, 2006; PHILPOTT e PROTCHENKO, 2008)

FIGURA 8 - ABSORÇÃO DE FERRO PELA MEMBRANA PLASMÁTICA DAS LEVEDURAS



A absorção do Fe^{+3} pela membrana plasmática da levedura é iniciada pela redução do ferro, catalisada pela enzima Fre1p. O Fe^{+2} formado é substrato para a Fet3p, a qual é parte do complexo de absorção de ferro de alta afinidade. O Fe^{+3} gerado pela Fet3p é transportado pela Ferropermease, Ftr1p.

FONTE: KWOK *et al.*, 2006

Sugere-se que o motivo pelo qual o Fe^{+3} seja reduzido pela enzima Fre1 para em seguida ser re-oxidado para que seu transporte ocorra pela proteína Ftr1, possa ser a necessidade de separar o ferro de agentes quelantes ou sideróforos. A re-oxidação a Fe^{+3} pode também servir para aumentar a especificidade enzima-substrato, pois a enzima Ftr1 é específica para este íon (SCHRODER, JOHNSON e DE VRIES, 2003).

A atividade oxidante da Fet3p é essencial para o transporte de ferro para o interior da célula, e esta atividade é dependente de cobre. A atividade da Fet3p também é dependente de oxigênio molecular (PHILPOTT e PROTCHENKO, 2008).

A função obrigatória do componente Fet3p no sistema de alta afinidade de transporte de ferro nas leveduras está diretamente relacionada com a quantidade deste micronutriente nas células e com a quantidade de cobre. O sistema Fet3p em

células deficientes em cobre estará inativo no que se refere a sua função de transportador de ferro para o interior das células, deste modo, células deficientes em cobre também estarão deficientes em ferro (HASSETT, ROMEO e KOSMAN, 1998).

Células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* cultivadas em meio anaeróbio não expressam os genes que codificam as proteínas associadas com o sistema de transporte de ferro de alta afinidade. O sistema de transporte de ferro de alta afinidade é regulado de duas formas pelo oxigênio molecular, sendo este não apenas um substrato essencial para o transporte, mas sua presença ou ausência no meio de cultivo modula a expressão desta atividade transportadora (HASSETT, ROMEO e KOSMAN, 1998).

Em condições de baixa oxigenação as células irão expressar um transportador de íon ferroso de baixa afinidade, Fet4p, que funciona como um sistema independente de oxigênio para o transporte de ferro para o interior da célula. Este mecanismo de baixa afinidade – que não é regulado pela presença de ferro – também transporta cobalto, cádmio e níquel (STEHLIK-THOMAS *et al.*, 2003; PHILPOTT e PROTCHENKO, 2008).

O ferro absorvido pelas leveduras é armazenado primeiramente nos vacúolos, possivelmente formando complexos com polifosfatos ou ácidos orgânicos, mas estas formas ainda não foram completamente esclarecidas. Quando o ferro está abundante no ambiente, os vacúolos o absorvem pela atividade de um sistema transportador de ferro e manganês. O acúmulo de ferro nos vacúolos protege as células dos seus efeitos nocivos, e permite que este seja utilizado quando houver diminuição de ferro extracelular (PHILPOTT e PROTCHENKO, 2008).

Além do acúmulo de ferro nos vacúolos, o ferro celular está presente no citoplasma e nas mitocôndrias. A mitocôndria é o local em que o ferro será transformado em cofatores heme e complexo ferro-enxofre. A partir destas formas, o ferro também poderá ser mobilizado para uso durante a deficiência deste nutriente no meio (PHILPOTT e PROTCHENKO, 2008).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 REAGENTES

Os reagentes utilizados nos experimentos estão relacionados na Tabela 2.

TABELA 2 - RELAÇÃO DE REAGENTES

REAGENTE	FABRICANTE
3,5-dinitrosalicilato	Merck
4,7-difenil-1,10-fenantrolina dissulfônica ácida	Sigma-Aldrich
α -D-glucose	Qeel
Acetato de amônio	Sigma-Aldrich
Ácido cítrico	Merck
Ácido clorídrico	Biotec
Ácido nítrico 65%	Sigma-Aldrich
Ácido sulfúrico	Merck
Ácido tartárico	Synth
Ascorbato de sódio	Sigma-Aldrich
Citrato férrico	Sigma-Aldrich
Cloranfenicol solução estéril	Allergan
Cloreto de sódio	Synth
Cloreto férrico hexaidratado	Sigma-Aldrich
Cloreto ferroso	Sigma-Aldrich
EDTA férrico	Sigma-Aldrich
Extrato de levedura	Oxoid
Extrato de malte	Biobrás
Fermento biológico Fleischmann's	AB Brasil
Hidróxido de sódio	Synth
Nitrato férrico nonaidratado	Sigma-Aldrich
Peptona de carne	Biobrás
Simeticone	Dow Corning
Sulfato férrico	Sigma-Aldrich
Tartarato de sódio e potássio	F. Maia

4.2 MICRO-ORGANISMO

O micro-organismo utilizado foi a levedura de panificação *Saccharomyces cerevisiae* proveniente de fermento biológico fresco da marca Fleishmann®, adquirido no comércio da cidade de Curitiba, estado do Paraná (Tabela 3).

TABELA 3 - IDENTIFICAÇÃO DO FERMENTO BIOLÓGICO ADQUIRIDO NO COMÉRCIO DA CIDADE DE CURITIBA - PR

Nome comercial	Fermento Biológico Fresco Fleishmann
Lote	02041
Fabricante	AB Brasil Indústria e Comércio de Alimentos LTDA.
Local de fabricação	Pederneiras, São Paulo
Validade	08 julho 2008
Ingredientes	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Observações	Conservar sob refrigeração entre 2 e 7°C

4.3 MEIOS DE CULTIVO

4.3.1 Meio *Yeast Medium*

O meio líquido *Yeast Medium* (YM) é composto pelos seguintes componentes: α -D-glucose 10 g l⁻¹; peptona 5 g l⁻¹; extrato de levedura 3 g l⁻¹; extrato de malte 3 g l⁻¹; água destilada (BARNETT, PAYNE e YARROW, 2000). Quando necessário, o pH do meio foi ajustado para valores de 4,0 a 5,0 com solução aquosa de ácido sulfúrico 1M. O meio foi esterilizado em autoclave vertical empregando-se calor úmido a 121°C de temperatura, pressão de 1 atm durante 20 minutos.

O meio líquido YM também foi empregado com concentrações de seus componentes aumentadas em 2, 4 e 6 vezes, conforme a Tabela 3, sendo estes denominados meio líquido YM 2%, meio líquido YM 4% e meio líquido YM 6%, respectivamente.

TABELA 4 - CONCENTRAÇÃO DOS COMPONENTES (g l⁻¹) EMPREGADAS NOS MEIOS YM 1%, YM 2%, YM 4% E YM 6%

	YM 1%	YM 2%	YM 4%	YM 6%
α -D-glucose (g l ⁻¹)	10	20	40	60
Peptona (g l ⁻¹)	5	10	20	30
Extrato de levedura (g l ⁻¹)	3	6	12	18
Extrato de malte (g l ⁻¹)	3	6	12	18

O meio YM foi acrescido de 20 g l⁻¹ de ágar quando utilizado na forma sólida.

O meio sólido YM, quando utilizado no cultivo do inóculo ou para a conservação periódica das cepas, foi distribuído na razão de 1/3 do volume total de tubos de cultivo, e após esterilização em autoclave vertical empregando-se calor úmido a 121°C de temperatura, pressão de 1 atm durante 20 minutos, inclina-se os tubos para solidificação do meio. Quando o meio YM sólido foi utilizado para técnica *pour plate* para o isolamento de leveduras, este foi esterilizado em autoclave vertical empregando-se calor úmido a 120°C de temperatura, pressão de 1 atm, durante 20 minutos, e distribuído nas placas. Necessitando-se adicionar solução de ácido tartárico 10% ou cloranfenicol, estes foram adicionados após esterilização do meio, quando o mesmo está com temperatura inferior a 50°C.

4.3.2 Meio YM suplementado com diferentes sais de ferro

Os sais de ferro utilizados para o presente trabalho foram selecionados a partir da revisão de literatura, avaliando-se as características físico-químicas, como solubilidade e toxicidade. Os experimentos foram realizados utilizando o meio líquido YM (item 4.3.1) suplementado com os sais de ferro: sulfato ferroso; sulfato férrico; cloreto ferroso; cloreto férrico; nitrato férrico; citrato férrico e EDTA férrico.

Os sais sulfato férrico, cloreto ferroso, cloreto férrico, nitrato férrico e EDTA férrico foram avaliados nas concentrações de 15 mg Fe l⁻¹ e de 25 mg Fe l⁻¹. O citrato férrico foi avaliado nas concentrações de 15 mg Fe l⁻¹, 25 mg Fe l⁻¹ e de 200 mg Fe l⁻¹. O sulfato ferroso foi avaliado nas concentrações de 0,03 mg Fe l⁻¹, 0,3 mg Fe l⁻¹, 0,6 mg Fe l⁻¹, 1,5 mg Fe l⁻¹, 15 mg Fe l⁻¹, 25 mg Fe l⁻¹, 50 mg Fe l⁻¹ e de 100 mg Fe l⁻¹.

Quando necessário, o pH do meio foi ajustado com solução de ácido sulfúrico 1M, solução de ácido cítrico 10%, solução de ácido clorídrico 1M ou solução de ácido nítrico 3%, dependendo do sal de ferro adicionado ao meio de cultivo, de forma que o ânion do sal fosse equivalente ao ânion do ácido de escolha. Para o EDTA férrico, utilizou-se solução de ácido sulfúrico 1 M.

Os meios empregados nos experimentos foram esterilizados em autoclave vertical empregando-se calor úmido a 120°C de temperatura, pressão de 1 atm, durante 20 minutos.

Quando necessário, o sal de ferro foi esterilizado em separado dos nutrientes. Para isso, foi feita uma solução concentrada dos nutrientes com 20% da água necessária e o sal de ferro esterilizado no restante da água destilada. Após a esterilização e diminuição da temperatura a solução contendo o sal de ferro foi vertida sobre a solução contendo os nutrientes do meio de cultivo.

4.4 OBTENÇÃO DA CEPA PURA DE *Saccharomyces cerevisiae*

Para a obtenção da cepa pura de *Saccharomyces cerevisiae* proveniente do fermento biológico foi preparada uma suspensão utilizando 1 g de fermento com 50 ml de solução salina estéril. A partir de 1 ml desta suspensão foram realizadas diluições sucessivas 1:10, em tubos contendo solução salina estéril. Em seguida 1 ml destas diluições foram semeadas em placas pela técnica *pour plate*, utilizando meio sólido YM. As placas foram colocadas em estufa a 29°C de temperatura durante 48 horas.

Após as 48 horas as colônias isoladas foram transferidas para frascos Erlenmeyer contendo meio líquido YM. Os frascos foram deixados em agitador-incubador de movimento rotatório durante 24 horas, a temperatura de 29°C, com agitação de 150 rpm. Após 24 horas foi verificada a pureza do cultivo por técnica a fresco.

Observando-se a presença de contaminantes, o procedimento de isolamento foi repetido semeando-se os cultivos líquidos contaminados em placas pela técnica *pour plate*, utilizando meio sólido YM adicionado de solução de ácido tartárico 10% até pH 4,5 e meio sólido YM acrescido de cloranfenicol 30 µg ml⁻¹ até a obtenção de cultivos puros de *Saccharomyces cerevisiae*. Os cultivos puros foram semeados em tubos com meio sólido YM inclinado. Os tubos foram mantidos em estufa a temperatura de 29°C durante 48 horas.

4.5 CONSERVAÇÃO DO MICRO-ORGANISMO

As cepas puras de *Saccharomyces cerevisiae* foram cultivadas em meio sólido YM e crescidas em estufa, a temperatura de 29°C durante 48 horas. Após o crescimento, as cepas foram mantidas em geladeira a 4°C com repiques trimestrais e em freezer a -20°C.

4.6 CULTIVOS

Os cultivos foram realizados com experimentos independentes em duplicata, sendo que os ensaios para as determinações de biomassa, açúcares redutores, ferro intracelular e ferro no meio de cultivo são realizadas em triplicata, e o desvio padrão (DP) foi calculado.

4.6.1 Preparo do inóculo

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi semeada em tubos para cultivo contendo meio YM sólido inclinado e deixada em estufa a temperatura de 29°C durante 48 horas. As células recém crescidas foram removidas dos tubos com o auxílio de uma alça estéril, utilizando meio líquido YM como diluente. Na suspensão de células recém preparada, foi determinado o número de células ml^{-1} .

Foi transferido um volume da suspensão de células recém preparada contendo $5 \cdot 10^7$ células para um frasco Erlenmeyer de 250 ml de capacidade contendo 50 ml de meio líquido YM 1%. O frasco foi colocado em agitador-incubador de movimento rotatório durante 12 horas, a temperatura de 29°C, com agitação de 150 rpm. Após este período, o conteúdo deste frasco foi vertido para um frasco Erlenmeyer de 2000 ml de capacidade contendo 400 ml de meio líquido YM 1%. O frasco foi colocado em agitador-incubador de movimento rotatório durante 12 horas, a temperatura de 29°C, com agitação de 150 rpm. Em seguida, foram transferidas alíquotas de 200 ml para dois frascos Erlenmeyer de 2000 ml de capacidade contendo 200 ml de meio líquido YM 2% cada. Os frascos foram colocados em agitador-incubador de movimento rotatório durante 12 horas, a temperatura de 29°C, com agitação de 150 rpm. Após 12 horas, o conteúdo destes dois frascos foi homogeneizado, e inoculado no reator.

4.6.2 Cultivo em frascos

Os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 500 ml de capacidade, contendo 100 ml de meio líquido YM, de modo a respeitar a proporção de 1:5 entre volume de meio e volume do frasco.

Foi transferido um volume de suspensão de células recém preparada (item 4.6.1) para o meio líquido YM sem e com suplementação de ferro (item 4.3.1 e 4.3.2), de forma a obter uma concentração inicial nos cultivos de 10^6 células ml^{-1} . Em seguida, os frascos foram mantidos em agitador-incubador de movimento rotatório a temperatura de 29°C, com agitação de 150 rpm, e os cultivos foram retirados em tempos pré estabelecidos e determinada a concentração celular, pH, concentração de açúcares redutores, ferro intracelular e ferro no meio de cultivo.

O tempo estabelecido para o término dos cultivos nos experimentos em frascos que estudaram a influência de diferentes sais de ferro em diferentes concentrações foi de 20 horas. Para o término dos cultivos nos experimentos em frascos que estudaram a cinética da incorporação de ferro intracelular, os tempos estabelecidos foram de 2 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 10 horas, 12 horas e 14 horas.

4.6.3 Cultivo em reator

Os cultivos foram realizados em fermentador New Brunswick Scientific Co, modelo Drive Assembly em reator de vidro de 5000 ml de capacidade, contendo 3600 ml de meio líquido YM 1% sem e com suplementação de 100 mg Fe l^{-1} empregando sulfato ferroso. Os cultivos tiveram seu início pela adição de 400 ml de inóculo (item 4.6.1). Foram mantidas as condições de 30°C de temperatura, 100 rpm de agitação e 2 volumes de ar/volume de meio/minuto (vvm) de aeração. O pH inicial dos cultivos foi em torno de 4,5 e não foram realizadas correções de pH durante o processo. Ao final do cultivo, após 12 horas, as células foram separadas do meio por centrifugação a 4000 rpm durante 5 minutos. No sobrenadante foi determinada a concentração de açúcares redutores (item 4.10) e ferro (item 4.11.1). As células obtidas foram lavadas com solução salina estéril para remoção do meio e foi determinada a concentração celular pelo método gravimétrico (item 4.8.2), ferro intracelular (item 4.11.1), teor de umidade (item 4.8.2) e capacidade fermentativa (item 4.13.1). Quando necessário, fez-se o uso de simeticone (anti-espumante).

4.7 AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS MICROSCÓPICAS

Uma alíquota do cultivo previamente homogeneizado foi transferida, em ambiente estéril, para um conjunto de lâmina e lamínula estéreis e visualizada em microscópio óptico, com lentes objetivas de aumento de 40 vezes para verificar a presença de contaminantes, presença de brotos nas células, formação de pseudo-hifa e presença de precipitados de sais de ferro.

4.8 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR

4.8.1 Determinação do número de células totais ml^{-1}

O número de células totais ml^{-1} foi determinado utilizando câmara de Neubauer® (CARVALHO, 1994) no preparo do inóculo, nos cultivos em frascos e em reator.

4.8.2 Método gravimétrico

Tubos de centrifuga foram secos em estufa até peso constante e deixados em dessecador até atingirem a temperatura ambiente, em seguida, foram pesados em balança analítica. Foi adicionado aos tubos 10 ml de cultivo e centrifugou-se a 7000 rpm durante 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi separado e, às células, adicionado solução salina, seguido de homogeneização em equipamento tipo Vórtex®. Em seguida, as células foram centrifugadas a 7000 rpm durante 10 minutos para a lavagem das mesmas. O sobrenadante foi descartado e repetiu-se o procedimento de lavagem até descarte de sobrenadante límpido. Os tubos contendo as células foram colocados em estufa a 60°C de temperatura durante 24 horas ou até peso constante. Os tubos foram pesados em balança analítica. O peso seco foi calculado e o resultado expresso em g%. Para os cultivos realizados em meio suplementado com ferro, a primeira lavagem foi realizada com ácido nítrico 3% para solubilizar possíveis precipitados de sais de ferro. O método gravimétrico também foi empregado para a determinação do teor de umidade.

4.9 DETERMINAÇÃO DE pH

Para todas as amostras coletadas durante os cultivos realizados em frascos e reator, o pH do cultivo foi medido em potenciômetro devidamente calibrado, à temperatura ambiente.

4.10 QUANTIFICAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES

Os açúcares redutores foram quantificados pelo método espectrofotométrico do 3,5-dinitrosalicilato, em comprimento de onda de 540 nm, método adaptado (MILLER, 1959; UFPR, 2001). O reagente 3,5-dinitrosalicilato permite determinar a quantidade de açúcares redutores presentes em solução, embora não seja adequado para misturas complexas de açúcares. Em meio alcalino e quando aquecido na presença de açúcares redutores, o 3,5-dinitrosalicilato forma o seu produto de redução, o ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, de coloração vermelho castanho, que pode ser doseado por espectrofotometria em comprimento de onda de 540 nm.

Foi preparado o reagente 3,5-dinitrosalicilato dissolvendo-se 5 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico em 100 ml de solução de hidróxido de sódio 2M com aquecimento. Dissolveu-se também, com aquecimento, 150 g de tartarato duplo de sódio e potássio em 250 ml de água destilada. As duas soluções foram misturadas ainda quentes e após resfriamento o volume foi completado para 500 ml.

A curva padrão para a determinação de açúcares redutores foi feita adicionando-se em tubos 100 µl uma solução padrão de modo a se obter concentrações de 20, 40, 80, 160 e 200 mg ml⁻¹ de glucose, em seguida foi adicionado 500 µl de água destilada, 400 µl de reagente 3,5-dinitrosalicilato e os tubos foram levados ao banho-maria fervente (100°C) por 5 minutos. Após este tempo, em todos os tubos foram adicionados 3000 µl de água destilada. Quando os tubos atingiram a temperatura ambiente, foi realizada leitura em Espectrofotômetro UV-VIS Shimadzu UV-1601PC em comprimento de onda de 540 nm.

A linearidade da curva padrão foi verificada com o cálculo da equação da reta, que foi superior a 0,999. Uma nova curva padrão foi realizada para a determinação

da concentração de açúcares redutores em todos os experimentos, uma vez que a solução padrão de glucose é instável.

Para a determinação da concentração de açúcares redutores nos cultivos foi utilizado um volume de 100 μ l de sobrenadante, e quando necessário, foram realizadas diluições do mesmo.

Os resultados são expressos em g l^{-1} de açúcares redutores.

4.11 QUANTIFICAÇÃO DE FERRO

4.11.1 Colorimetria

As determinações de concentração de ferro intracelular e presentes no meio de cultivo foram realizadas por uma metodologia adaptada de Tamarit e colaboradores (2006). Estes pesquisadores estudaram um método colorimétrico para quantificar a presença de ferro intracelular em leveduras que consiste de duas etapas; a primeira realiza um tratamento para liberar o ferro complexado e a segunda etapa determina quantitativamente este ferro (TAMARIT *et al.*, 2006).

Tubos de polipropileno contendo 1 ml do cultivo foram centrifugados a 3000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e a massa celular lavada com água destilada, seguido de centrifugação e descarte do sobrenadante. Este processo foi repetido duas vezes. As células foram então suspendidas em 1000 μ l de ácido nítrico 3% e os tubos foram colocados em estufa durante 24 horas, a temperatura de 98°C. Após este período, os tubos foram centrifugados a 3000 rpm durante 5 minutos. Uma alíquota do sobrenadante foi pipetada em tubos pré-tratados com ácido nítrico, e em seguida, foi adicionado 320 μ l de solução de ascorbato de sódio 38 g l^{-1} , 480 μ l de solução de acetato de amônio 385,4 g l^{-1} e 640 μ l do quelante para ferro 4,7-difenil-1,10-fenantrolina dissulfônica ácida (BPS) 1,7 g l^{-1} ; após 5 minutos, a leitura da absorbância foi realizada em Espectrofotômetro UV-VIS Shimadzu UV-1601PC em comprimento de onda de 535 nm.

As avaliações por colorimetria acompanharam a curva padrão com o sal de ferro avaliado, com concentrações de 1 a 10 $\mu\text{g Fe}$. A linearidade da curva padrão foi verificada com o cálculo da equação da reta, que foi superior a 0,999.

Os resultados são expressos em mg Fe g^{-1} célula seca.

4.11.2 Espectrometria de absorção atômica

A quantificação de ferro foi realizada no laboratório do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos (CEPPA), da Universidade Federal do Paraná; utilizando o Espectrômetro de Absorção Atômica Varian Spectra AA 100-200. A quantificação de ferro por espectrometria de absorção atômica foi realizada em pães preparados utilizando leveduras cultivadas em reator contendo meio sem e com suplementação de ferro. As amostras de pão foram pesadas (1 g) e tratadas com 5 ml de ácido nítrico e 1 ml de peróxido de hidrogênio com aquecimento em sistema fechado utilizando-se um condensador de refluxo e filtradas para balão volumétrico de 100 ml. As amostras foram analisadas comparando-se com uma curva analítica equivalente a concentração do analito.

4.12 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DO CULTIVO

A comparação quantitativa entre as diferentes condições de cultivo é possível por intermédio de variáveis como as velocidades de transformação e os fatores de conversão. O estudo cinético de um processo fermentativo consiste inicialmente na análise da evolução dos valores de concentração de um ou mais componentes do sistema de cultivo em função do tempo da fermentação. Uma definição especial de velocidade é a produtividade em biomassa ou a concentração do produto, denominada produtividade do produto, cujo interesse prático está na avaliação do desempenho de um processo (HISS, 2001). Os parâmetros cinéticos de produtividade em biomassa e produtividade em produto foram calculados para os cultivos em frascos.

4.12.1 Produtividade em biomassa

A produtividade em biomassa representa a velocidade média de crescimento, referente ao tempo do cultivo, e pode ser calculada pela equação (1) (HISS, 2001).

$$P_x = (X_i - X_0) / t_f \quad (1)$$

Onde: P_x = produtividade em biomassa ($\text{g l}^{-1} \text{h}^{-1}$)

X_t = concentração de biomassa seca (g l^{-1}) no tempo t de cultivo

X_0 = concentração de biomassa seca no início do cultivo

T_f = tempo de cultivo (h)

4.12.2 Produtividade em produto

A produtividade em produto representa a velocidade média de formação do produto em relação ao tempo de cultivo e pode ser calculada pela equação (2) (HISS, 2001).

$$P_p = (P_t - P_0) / t_f \quad (2)$$

Onde: P_p = produtividade em produto ($\text{mg Fe g}^{-1} \text{célula seca h}^{-1}$)

P_t = concentração de produto ($\text{mg Fe g}^{-1} \text{célula seca}$) no tempo t de cultivo

P_0 = concentração de produto ($\text{mg Fe g}^{-1} \text{célula seca}$) no início do cultivo

T_f = tempo de cultivo (h)

4.13 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE FERMENTATIVA

4.13.1 Medida do volume de água deslocado com a formação de gás carbônico

A avaliação da capacidade fermentativa das leveduras pode ser avaliada medindo-se o volume produzido de gás carbônico (CO_2) durante a fermentação de uma solução 10% de açúcar a 30°C de temperatura, pois o volume gás carbônico produzido desloca o mesmo volume de água de um recipiente fechado. A quantidade de água deslocada foi anotada em intervalos de 30 minutos durante 120 minutos (WALTER, 1953).

A metodologia utilizada para a determinação da capacidade fermentativa das células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* cultivadas em reator foi adaptada de Walter, 1953.

A Figura 9 demonstra o equipamento utilizado para a medida do volume de água deslocada a partir da produção de gás carbônico pelas células da levedura. Uma quantidade de biomassa celular úmida equivalente a $1,2 \cdot 10^{10}$ células foi pesada e as células ressuspendidas em 50 ml de solução de α -D-glucose 10%. Esta suspensão foi colocada em um balão de fundo redondo de 250 ml de capacidade que permaneceu em banho-maria a temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$. Aguardou-se 30 minutos e fechou-se o sistema acoplando-se o balão de fundo redondo à um recipiente com água usando uma conexão de vidro com rolhas nas extremidades. Este recipiente possui uma saída de água pela parte inferior com um conector elevado à altura do nível da água. A água deslocada foi coletada em uma proveta.

FIGURA 9 - EQUIPAMENTO PARA A MEDIDA DO DESLOCAMENTO DE ÁGUA A PARTIR DA PRODUÇÃO DE GÁS CARBÔNICO PELAS CÉLULAS DA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae*



6.1: Balão de fundo redondo de 250 ml de capacidade. 6.2: Conexão de vidro com rolhas nas extremidades 6.3: Recipiente com água. 6.4: Saída de água do recipiente pela parte inferior com um conector elevado à altura do nível da água.

Os resultados da capacidade fermentativa determinado pelo volume de água deslocado são expressos em ml de água deslocados em função do tempo.

4.13.2 Elaboração de pães

A capacidade fermentativa das leveduras obtidas também foi realizada a partir da elaboração de pães. Foram preparados dois pães, um utilizando as leveduras

cultivadas em meio YM 1% sem suplementação e outro utilizando leveduras cultivadas em meio YM 1% suplementado com 100 mg Fe l^{-1} empregando sulfato ferroso.

Para a elaboração dos pães foi utilizado: açúcar comercial refinado (5,5 g), farinha de trigo comercial (280 g), gordura vegetal hidrogenada (13,5 g), sal (2,5 g) e água mineral (100 ml).

Foi pesada uma quantidade equivalente a $1,2 \cdot 10^{11}$ células de leveduras, estas foram misturadas com água na temperatura de 37°C e 2 g de açúcar, aguardou-se a formação de bolhas. A farinha de trigo foi misturada com a gordura vegetal hidrogenada previamente derretida, com o sal e com o restante do açúcar. Após a formação e retenção de bolhas, a mistura contendo as leveduras, água e açúcar, foi combinada com os outros ingredientes de maneira homogênea. Uma quantidade de 2 g da massa foi separada do restante para o teste do poder de subida. Para este teste, a massa foi imersa em água, e foi anotado o tempo em que a massa levou para subir até a superfície.

Esperou-se o crescimento do pão até o dobro do seu volume. A massa foi novamente misturada de forma homogênea e colocada em forma apropriada. Após o crescimento da massa até o dobro do seu volume, os pães foram assados em forno comercial a temperatura de 180°C durante 45 minutos. Os pães tiveram o seu teor de ferro determinado.

4.14 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para a análise estatística dos resultados, utilizou-se o programa Statistica 8.0 para Windows (Stat Soft Inc.; Tulsa, OK). As análises de normalidade foram realizadas pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Para comparação entre as médias obtidas, utilizou-se análise de variância (ANOVA) corrigida pelo teste Tuckey HSD (Honest Significant Difference) e para comparação de médias entre variáveis independentes foi utilizado teste t de Student, adotando-se, para ambos os testes, um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO DA CEPA PURA DE *Saccharomyces cerevisiae*

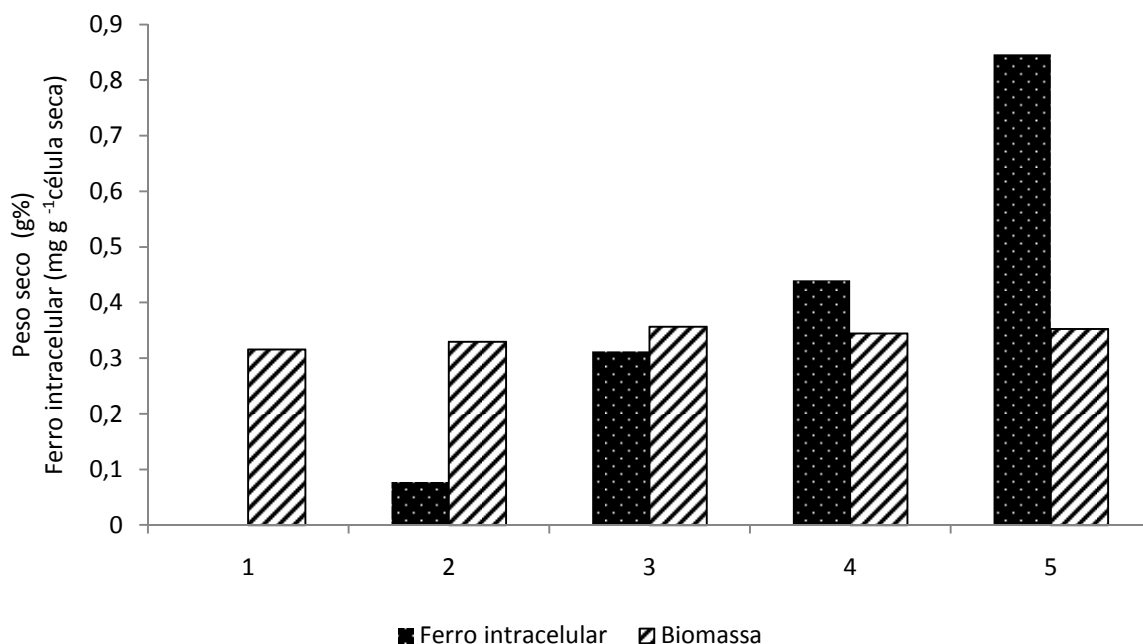
O fermento biológico comercial adquirido foi escolhido para ser utilizado nos experimentos por ser considerado de importância industrial e usualmente utilizado para panificação. Esta levedura encontra-se no mercado, sendo facilmente adquirida, isolada e ativada, possibilitando o seu uso em experimentos futuros que visem o estudo da incorporação de ferro em levedura de panificação *Saccharomyces cerevisiae*. Não foram escolhidas cepas de coleções ou cepas mutantes que tenham sido previamente adaptadas para sobreviver em elevadas concentrações de ferro no meio de cultivo, pois, no caso das cepas mutantes, estas podem não apresentar uma mutação estável.

A visualização microscópica das células presentes no fermento mostrou a necessidade de se adicionar ao meio YM sólido substâncias inibidoras do desenvolvimento de bactérias contaminantes, mas que não prejudicassem o desenvolvimento da levedura. A cultura pura conseguida foi identificada, conservada e utilizada nos experimentos.

5.2 CULTIVO EM FRASCOS

Com o objetivo de avaliar a formação de biomassa e a incorporação de ferro pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* foram realizados cultivos em meio líquido YM 1% suplementado com sulfato ferroso em concentrações entre $0,03 \text{ mg Fe l}^{-1}$ a $1,5 \text{ mg Fe l}^{-1}$. Os valores de biomassa e incorporação de ferro pela levedura estão demonstrados na Figura 10.

FIGURA 10 - VARIAÇÃO NA CONCENTRAÇÃO DE FERRO (mg g^{-1} célula seca) INCORPORADO PELA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* E FORMAÇÃO DE BIOMASSA (g%) APÓS 20 HORAS DE CULTIVO EM MEIO YM 1% SUPLEMENTADO COM SULFATO FERROSO



Representação da formação de biomassa e incorporação de ferro pela levedura de panificação *Saccharomyces cerevisiae* em cultivos realizados em meio YM 1%. **1.** Sem suplementação de sais de ferro **2.** Suplementado com $0,03 \text{ mg Fe l}^{-1}$ empregando sulfato ferroso **3.** Suplementado com $0,30 \text{ mg Fe l}^{-1}$ empregando sulfato ferroso **4.** Suplementado com $0,60 \text{ mg Fe l}^{-1}$ empregando sulfato ferroso **5.** Suplementado com $1,50 \text{ mg Fe l}^{-1}$ empregando sulfato ferroso.

Foi verificado pelos resultados apresentados na Figura 10 que todas as concentrações utilizadas de ferro para suplementar o meio de cultivo apresentaram valores de biomassa semelhantes a $0,310 \text{ g\%}$, obtida no cultivo sem suplementação. Isto provavelmente deve-se ao fato de que as concentrações utilizadas estarem próximas a concentração de ferro da composição elementar da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, apresentadas na Tabela 1 (página 25). Sugere-se que a levedura utilizou o ferro presente no meio de cultivo para suas atividades metabólicas, principalmente atividades relacionadas à oxidação da glucose (PHILPOTT e PROTCHENKO, 2008). Sendo assim, a concentração de ferro utilizada para suplementar o meio de cultivo pode ser superior a $1,5 \text{ mg Fe l}^{-1}$, para que a levedura acumule mais ferro intracelularmente.

A determinação da concentração ótima de micronutrientes no meio de cultivo para o crescimento de células de leveduras, bem como a concentração próxima da qual os micronutrientes irão inibir a formação de biomassa, é um processo complexo, que depende do micro-organismo utilizado e da composição do meio de

cultivo. A complexidade do meio de cultivo, as interações dos íons metálicos com outros íons metálicos e com compostos orgânicos, o pH, e em alguns casos, o uso de diferentes sistemas de transportes de micronutrientes pelo micro-organismo podem dificultar a determinação precisa dessa concentração (MRVCIC *et al.*, 2007).

Os sais de ferro podem ser adicionados ao meio de cultivo, mas dependendo da concentração utilizada e do método de esterilização, estes sais podem sofrer processos de oxidação ou hidrólise.

A produção de leveduras enriquecidas com diferentes minerais geralmente requer condições específicas de crescimento (GAUDREAU, TOMPKINS e CHAMPAGNE, 2001).

Para verificar a influência dos sais sulfato ferroso, sulfato férrico, cloreto ferroso, cloreto férrico, nitrato férrico, citrato férrico e EDTA férrico na formação de biomassa da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e no acúmulo de ferro intracelular, cultivou-se a levedura em meio YM 1% suplementado com 15 mg Fe l⁻¹ e 25 mg Fe l⁻¹ dos sais de ferro.

Os cultivos realizados com meios suplementados com 15 mg Fe l⁻¹ e 25 mg Fe l⁻¹ empregando sulfato férrico, cloreto férrico e nitrato férrico não puderam ser avaliados em relação a formação de biomassa devido a precipitação destes sais após esterilização ou mistura com os nutrientes do meio de cultura, conforme demonstrado na Tabela 7, página 64. A precipitação dos sais durante o cultivo também pode interferir na determinação de ferro intracelular, desta forma, estes três sais não foram empregados nos experimentos que estudam a formação de biomassa e incorporação de ferro.

O íon ferroso é estável em condições anaeróbias e em pH ácido, entretanto sua oxidação é rápida em condições de aerobiose ou pH acima de 5,0. O íon férrico também reage rapidamente em ambientes aquosos e forma precipitados (hidróxidos, óxidos, fosfatos ou sulfato) pouco solúveis, em torno de 10⁻¹⁸ M (SCHRODER, JOHNSON e DE VRIES, 2003).

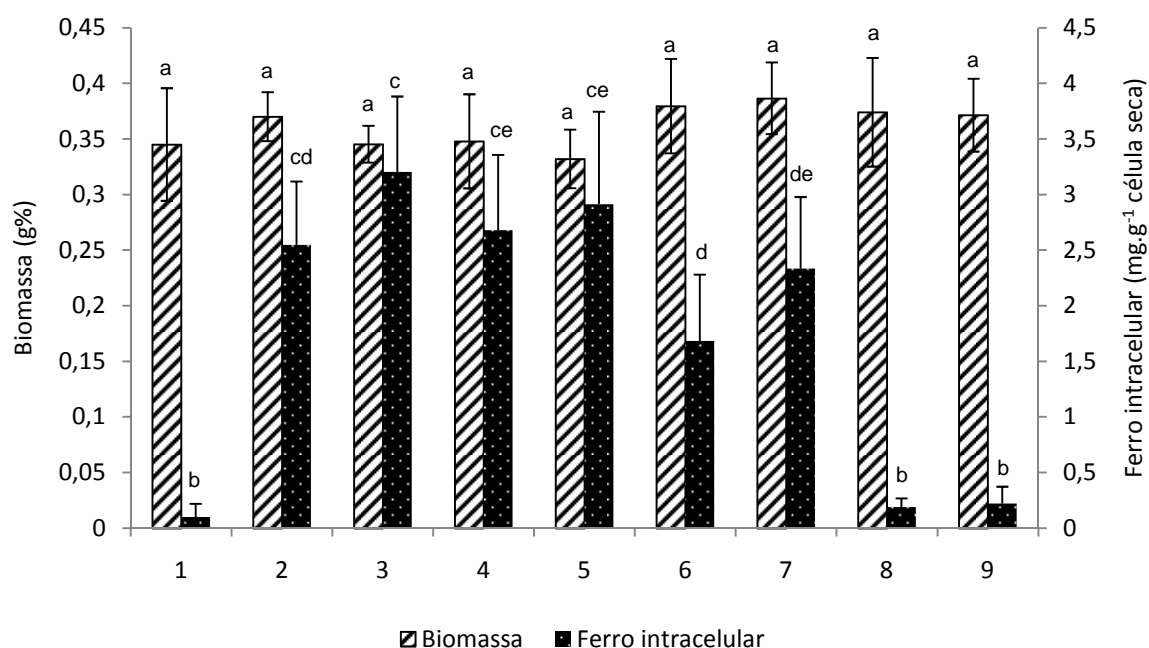
Segundo Pas e colaboradores (2007) a razão para o aparecimento de precipitados no meio de cultivo pode estar relacionada com a presença de hidróxidos de ferro ou formação de fosfatos de ferro pouco solúveis. Além disso, sais férricos mostram-se mais propícios às reações de oxidação que os sais ferrosos.

Por esta razão, durante o preparo dos meios de cultivo contendo sal de ferro, o pH inicial foi ajustado para valores entre 4,0 e 5,0, o que auxiliou na solubilização

do ferro, e também foi adequado para o desenvolvimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Os valores de biomassa e incorporação de ferro pela levedura estão demonstrados na Figura 11.

FIGURA 11 - VARIAÇÃO NA CONCENTRAÇÃO DE FERRO (mg g^{-1} célula seca) INCORPORADO PELA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* E FORMAÇÃO DE BIOMASSA (g\%) APÓS 20 HORAS DE CULTIVO EM MEIO YM 1% SUPLEMENTADO COM DIFERENTES SAIS DE FERRO



Representação da média \pm DP da formação de biomassa e a média \pm DP da incorporação de ferro pela levedura de panificação *Saccharomyces cerevisiae* em cultivos realizados em meio YM 1%. **1.** Sem suplementação de sais de ferro **2.** Suplementado com 15 mg Fe l^{-1} empregando sulfato ferroso **3.** Suplementado com 25 mg Fe l^{-1} empregando sulfato ferroso **4.** Suplementado com 15 mg Fe l^{-1} empregando cloreto ferroso **5.** Suplementado com 25 mg Fe l^{-1} empregando cloreto ferroso **6.** Suplementado com 15 mg Fe l^{-1} empregando citrato férrico **7.** Suplementado com 25 mg Fe l^{-1} empregando citrato férrico **8.** Suplementado com 15 mg Fe l^{-1} empregando EDTA férrico **9.** Suplementado com 25 mg Fe l^{-1} empregando EDTA férrico. Resultados referentes à formação de biomassa e à concentração de ferro incorporado classificados com letras distintas são diferentes entre si ($p < 0,05$).

Os valores de formação de biomassa e incorporação de ferro pela levedura apresentaram perfil de distribuição normal, segundo teste de Kolmogorov-Smirnov.

Na Figura 11, as médias de formação de biomassa em todos os grupos quando comparadas pelo teste ANOVA não mostraram diferença significativa na formação de biomassa entre os grupos suplementados com diferentes sais de ferro ($p = 0,239$).

Comparando-se as médias utilizando o teste *t* de Student para variáveis independentes, houve diferença significativa ($p = 0,048$) nos valores de formação de biomassa entre os cultivos suplementados com sulfato ferroso 15 e 25 mg Fe l⁻¹. Esta diferença na formação de biomassa foi em torno de 8% e pode ser atribuída a variações experimentais no decorrer das análises.

Na Figura 11, os resultados mostram que os cultivos suplementados com sulfato ferroso 15 mg Fe l⁻¹ e 25 mg Fe l⁻¹ e cloreto ferroso 15 mg Fe l⁻¹ e 25 mg Fe l⁻¹ apresentaram valores estatisticamente superiores de ferro intracelular, em torno de 2,832 mg Fe g⁻¹ célula seca. A maior concentração de ferro intracelular observada nos cultivos suplementados com sulfato ferroso e cloreto ferroso pode estar relacionada com o fato de estes sais terem sua parte aniônica derivada de ácidos fortes, e provavelmente estão na sua forma dissociada no meio de cultivo, disponibilizando ferro livre para ligar-se com a parede celular das células das leveduras.

A etapa de ligação dos íons de ferro à parede celular das células de levedura (biossorção) é um processo físico-químico, metabolicamente passivo em que ocorre adsorção ou troca iônica, sendo uma etapa essencial para que possa ocorrer a bioacumulação do metal (CHOJNACKA, 2010).

A incorporação de metais por células de leveduras sofre influência de uma série de fatores ambientais e relacionados ao cultivo, tais como, pH, temperatura e presença de outros íons em solução. As condições de cultivo influenciam consideravelmente a composição das células de leveduras e, por consequência, a sua habilidade em ligar-se com os metais presentes no meio de cultivo. A parede celular das células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* possui muitos sítios potenciais para a ligação de íons metálicos, sendo pouco provável que um único tipo de molécula ou grupo funcional seja responsável pela fase de biossorção (DOSTALEK, PATZAK e MATEJKA, 2004).

Pas e colaboradores (2007) explicam que a diferença entre os cultivos suplementados com diferentes sais de ferro pode estar relacionada com o ânion do sal, que se encontra no meio de cultivo.

Existem poucos estudos a respeito do transporte e regulação da concentração de ânions cloreto nas células de levedura. Pesquisas consideravam as células de leveduras impermeáveis ao ânion cloreto, devido ao fato de o transportador de cloreto ser muito mais lento que os transportadores de outros íons

(JENNINGS e CUI, 2008). Outros estudos mostram que elevadas concentrações de cloreto de sódio no meio de cultivo podem desviar o metabolismo para a produção de glicerol, visando amenizar o efeito do estresse osmótico provocado por este sal, mas não se sabe se os efeitos são provocados pelo cátion sódio ou pelo ânion cloreto (BLOMBERG, 2000).

Nielsen e Arneborg (2007) relatam que o ácido cítrico, em cultivos aeróbios ajustados para pH 3,5, altera a transcrição e produção de proteínas em culturas de *Saccharomyces cerevisiae*. O mecanismo pelo qual o ácido cítrico inibe o crescimento da levedura, está diretamente associado com o pH do meio. O pH do meio mais elevado promoverá a dissociação do ácido cítrico e ele irá quelar os íons Ca^{+2} e Mg^{+2} do meio de cultura. Desta forma, o metabolismo de produção de ATP da levedura estará alterado e a célula irá produzir menor quantidade de ATP (NIELSEN e ARNEBORG, 2007).

No caso dos cultivos realizados, suplementados com 15 mg Fe l^{-1} e 25 mg Fe l^{-1} de citrato férrico, pelos resultados de formação de biomassa apresentados (Figura 11), sugere-se que a quantidade de citrato presente no meio não foi suficiente para alterar o metabolismo respiratório das leveduras, ou o pH 4,0 do cultivo auxiliou para que o citrato férrico não estivesse na sua forma dissociada, explicando também a menor incorporação de ferro intracelular, comparativamente aos cultivos suplementados com sulfato ferroso e cloreto ferroso.

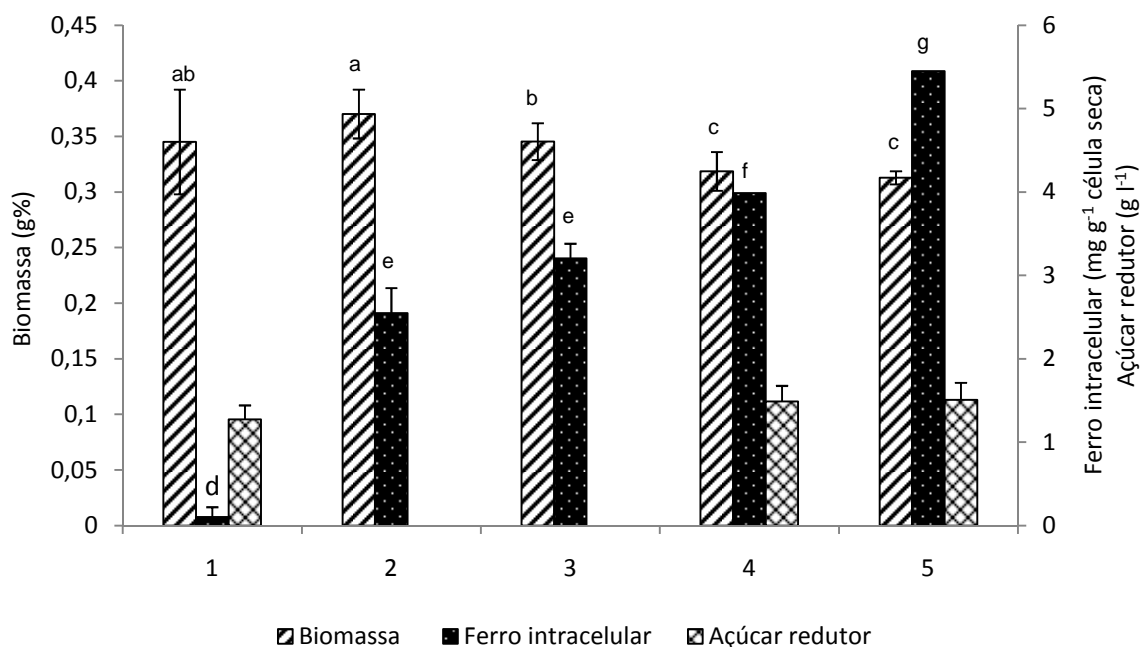
A quantidade ferro intracelular incorporado nas células dos cultivos suplementados com EDTA férrico apresentados na Figura 11 foram em torno de $0,207 \text{ mg Fe g}^{-1}$ célula seca. Estes valores são estatisticamente semelhantes ao valor do ferro intracelular presente nas células do cultivo sem suplementação, que foi de $0,103 \text{ mg Fe g}^{-1}$ célula seca. Estes resultados coincidem com os resultados encontrados por Pas e colaboradores (2007) em que a suplementação do meio de cultivo com EDTA férrico não influenciou o acúmulo de ferro intracelular na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, sendo que o valor de ferro intracelular ficou próximo ao cultivo sem suplementação. Isto provavelmente ocorre porque o EDTA férrico é um complexo estável no meio de cultivo, disponibilizando menor quantidade de ferro livre para se ligar às paredes das células de levedura. Pas e colaboradores (2007) explicam que as células de levedura possuem em sua parede celular uma metaloredutase que reduz os íons férricos do EDTA férrico, a íons ferrosos. Estes íons ferrosos são sequestrados pelo EDTA livre formando complexos de EDTA

ferroso, os quais são inacessíveis às células de levedura. Isto explica que alguns complexos podem ser mais estáveis no meio de cultivo, disponibilizando menor quantidade de ferro livre que possa ser utilizado pelas células de leveduras (PAS *et al.*, 2007).

O EDTA férrico não se mostrou promissor para promover a incorporação de ferro pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* nas concentrações empregadas.

Considerando-se os valores de incorporação de ferro de $2,548 \text{ mg Fe g}^{-1}$ célula seca e $3,206 \text{ mg Fe g}^{-1}$ célula seca e os valores de biomassa de $0,370 \text{ g\%}$ e $0,345 \text{ g\%}$ nos cultivos suplementados com 15 mg Fe l^{-1} e 25 mg Fe l^{-1} respectivamente, empregando sulfato ferroso demonstrados na Figura 11, foram avaliados cultivos suplementados com sulfato ferroso, nas concentrações de 50 mg Fe l^{-1} e 100 mg Fe l^{-1} . Os resultados obtidos encontram-se demonstrados na Figura 12.

FIGURA 12 - COMPARAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR, CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCAR REDUTOR RESIDUAL E INCORPORAÇÃO DE FERRO PELA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* APÓS 20 HORAS DE CULTIVO EM MEIO YM 1% SEM E COM SUPLEMENTAÇÃO DE 50 E 100 mg Fe l^{-1} DE SULFATO FERROSO



Representação da média \pm DP da formação de biomassa, média \pm DP da incorporação de ferro pela levedura de panificação *Saccharomyces cerevisiae* e média \pm DP da concentração de açúcar redutor residual em cultivos realizados em meio YM 1% **1.** Sem suplementação de sais de ferro **2.** Suplementado com 15 mg Fe l^{-1} empregando sulfato ferroso (previamente apresentado na Figura 11). **3.** Suplementado com 25 mg Fe l^{-1} empregando sulfato ferroso (previamente apresentado na Figura 11) **4.** Suplementado com 50 mg Fe l^{-1} empregando sulfato ferroso **5.** Suplementado com 100 mg Fe l^{-1} empregando sulfato ferroso. Resultados referentes à formação de biomassa e à concentração de ferro incorporado classificados com letras distintas são diferentes entre si ($p < 0,05$).

Os valores de formação de biomassa e incorporação de ferro pela levedura apresentaram perfil de distribuição normal, segundo teste de Kolmogorov-Smirnov.

Na Figura 12, as médias de formação de biomassa e valores de ferro intracelular em todos os grupos foram comparadas pelo teste *t* de Student para variáveis independentes.

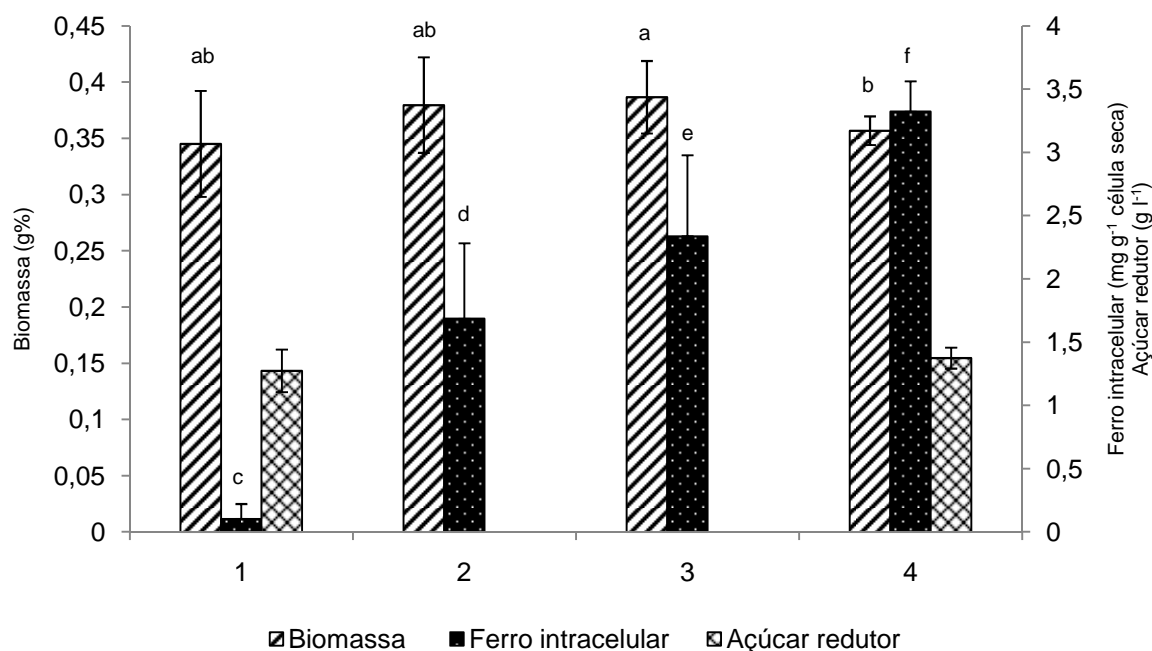
Observa-se pela Figura 12 que ocorreu diminuição na formação de biomassa no cultivo com adição de 50 mg Fe l⁻¹ comparativamente ao cultivo suplementado com 25 mg Fe l⁻¹. Os cultivos suplementados com sulfato ferroso nas concentrações de 50 e 100 mg Fe l⁻¹ apresentaram formação de biomassa semelhantes ($p = 0,437$), em torno de 0,316 g%, entretanto a incorporação de ferro no cultivo suplementado com 100 mg Fe l⁻¹ foi de 5,43 mg Fe g⁻¹ célula seca, significativamente superior ($p < 0,001$) ao cultivo adicionado de 50 mg Fe l⁻¹, que possibilitou a incorporação de 3,98 mg Fe g⁻¹ célula seca.

O valor de glucose inicial presente nos meios sem e com suplementação de ferro utilizados neste experimento foi de 10 g l⁻¹. A concentração residual de açúcares redutores após 14 horas de cultivo foi de 1,2 g l⁻¹; 1,4 g l⁻¹ e 1,5 g l⁻¹ nos cultivos sem, com suplementação de 50 mg Fe l⁻¹ e 100 mg Fe l⁻¹ de sulfato ferroso, respectivamente.

Os resultados da Figura 12 mostram que o aumento na concentração em até 100 mg Fe l⁻¹ de sulfato ferroso no meio de cultivo não inibiu a incorporação de ferro e nem a formação de biomassa pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Considerando-se os dados apresentados na Figura 11 de formação de biomassa e a concentração empregada de 100 mg Fe l⁻¹ foram realizados experimentos utilizando 200 mg Fe l⁻¹ de citrato férrico no meio líquido YM 1%, e os resultados encontram-se demonstrados na Figura 13.

FIGURA 13 - COMPARAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR, CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCAR REDUTOR RESIDUAL E INCORPORAÇÃO DE FERRO PELA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* APÓS 20 HORAS DE CULTIVO EM MEIO YM 1% SEM E COM SUPLEMENTAÇÃO DE 200 mg Fe l⁻¹ DE CITRATO FÉRRICO



Representação da média \pm DP da formação de biomassa, média \pm DP da incorporação de ferro pela levedura de panificação *Saccharomyces cerevisiae* e média \pm DP da concentração de açúcar redutor residual em cultivos realizados em meio YM 1% **1.** Sem suplementação de sais de ferro **2.** Suplementado com 15 mg Fe l⁻¹ empregando citrato férrico (previamente apresentado na Figura 11) **3.** Suplementado com 25 mg Fe l⁻¹ empregando citrato férrico (previamente apresentado na Figura 11) **4.** Suplementado com 200 mg Fe l⁻¹ empregando citrato férrico. Resultados referentes à formação de biomassa e à concentração de ferro incorporado classificados com letras distintas são diferentes entre si ($p < 0,05$).

Os valores de formação de biomassa e incorporação de ferro pela levedura apresentaram perfil de distribuição normal, segundo teste de Kolmogorov-Smirnov.

Na Figura 13, as médias de formação de biomassa e valores de ferro intracelular em todos os grupos foram comparadas pelo teste t de Student para variáveis independentes.

Verifica-se na Figura 13 que a adição de 200 mg Fe l⁻¹ no meio de cultivo não afetou a formação de biomassa comparativamente ao cultivo suplementado com 15 mg Fe l⁻¹ empregando citrato férrico ($p = 0,163$). Houve diferença significativa ($p = 0,036$) na formação de biomassa comparando-se os cultivos suplementados com 25 e 200 mg Fe l⁻¹, entretanto esta diferença foi em torno de 8%, podendo ser atribuída a variações experimentais.

Comparando-se as Figuras 12 e 13 verifica-se que as células do cultivo realizado com 50 mg Fe l⁻¹ e 100 mg Fe l⁻¹ em sulfato ferroso incorporaram mais

ferro (3,98 mg Fe g⁻¹ célula seca e 5,43 mg Fe g⁻¹ célula seca, respectivamente) que o cultivo realizado com 200 mg Fe l⁻¹ em citrato férrico, que incorporou 3,322 mg Fe g⁻¹ célula seca.

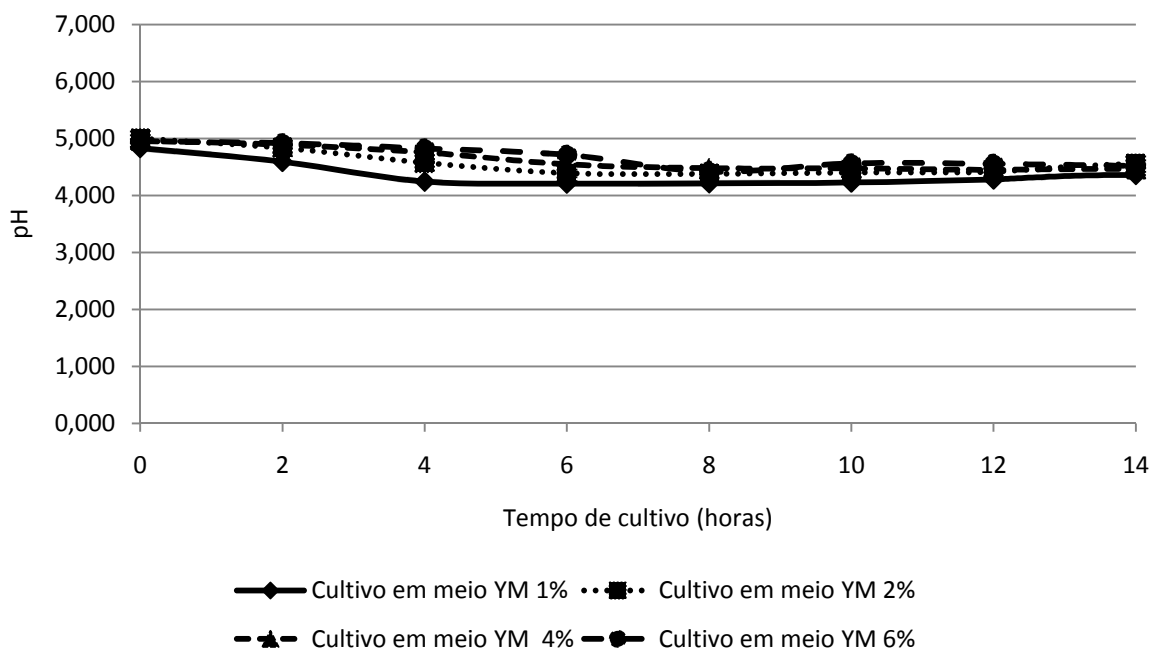
Pas e colaboradores (2007) não conseguiram adicionar sulfato ferroso aos cultivos, devido a precipitações. O sal de ferro mais facilmente incorporado ao meio de cultivo empregado pelos autores foi o citrato férrico. Os autores estudaram a incorporação de ferro utilizando meio quimicamente definido. A utilização do citrato férrico na concentração de 1mM (equivalente a 245 mg Fe l⁻¹) possibilitou o acúmulo de 13,931 mg Fe g⁻¹ célula seca na levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Dentre os sais sulfato ferroso, sulfato férrico, cloreto ferroso, cloreto férrico, nitrato férrico, citrato férrico e EDTA férrico, o sulfato ferroso e o citrato férrico quando adicionados ao meio líquido YM 1% possibilitaram acúmulo intracelular de ferro sem afetar a formação de biomassa. Entre o sulfato ferroso e o citrato férrico, o sulfato ferroso promoveu maior acúmulo intracelular de ferro.

A suplementação com 100 mg Fe l⁻¹ empregando o sulfato ferroso possibilitou maior acúmulo intracelular de ferro dentre as concentrações estudadas sem apresentar interação com os nutrientes presentes no meio de cultivo.

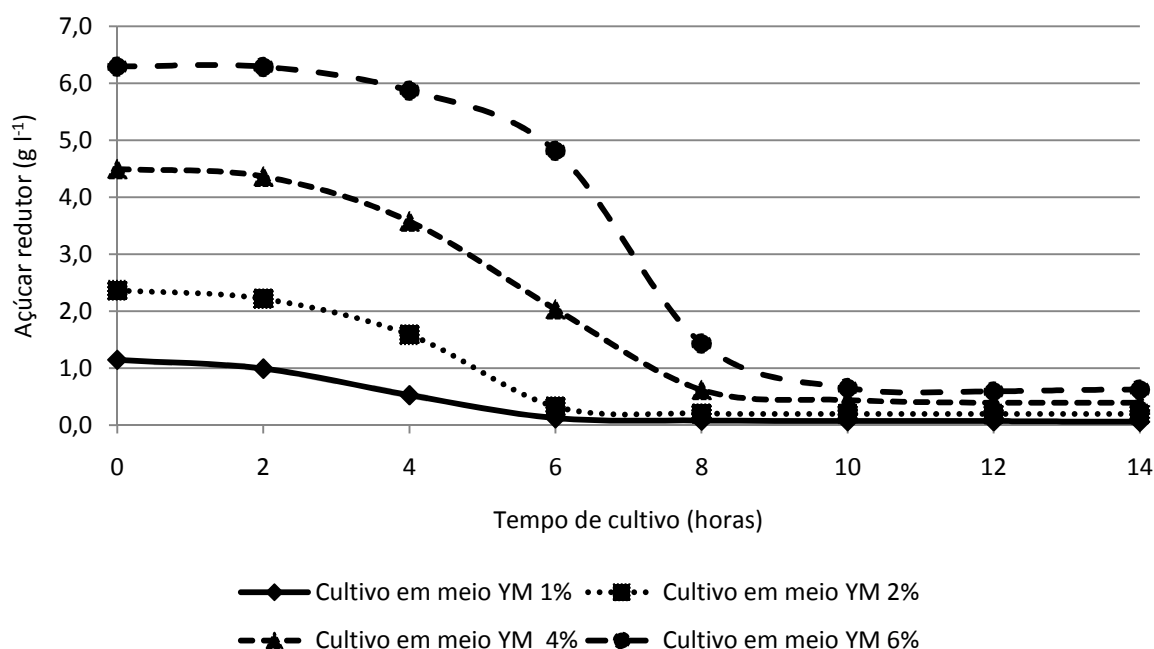
Esta concentração foi utilizada para verificar a incorporação de ferro pela levedura de panificação *Saccharomyces cerevisiae* em meio YM líquido 1%, YM líquido 2%, YM líquido 4% e YM líquido 6% em cultivos em frascos. Os resultados obtidos de pH do cultivo, concentração de açúcares redutores, formação de biomassa, incorporação de ferro pela levedura e presença de ferro no meio de cultivo estão apresentados nas Figuras 14, 15, 16, 17 e 18, respectivamente.

FIGURA 14 - VARIAÇÃO DO pH EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CULTIVO DA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* EM MEIO YM SUPLEMENTADO COM 100 mg Fe l^{-1} DE SULFATO FERROSO EMPREGANDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NUTRIENTES



Verifica-se pela Figura 14 que o pH dos cultivos com meio YM suplementado com 100 mg Fe l^{-1} empregando diferentes concentrações de nutrientes, iniciaram com valores semelhantes, em torno de 5,0, e ao final das 26 horas de cultivo apresentaram valores entre 4,1 e 4,8. Desta forma, os valores de pH permaneceram adequados para o crescimento da levedura e possibilitar a solubilização do sulfato ferroso nos diferentes meios de cultivo utilizados.

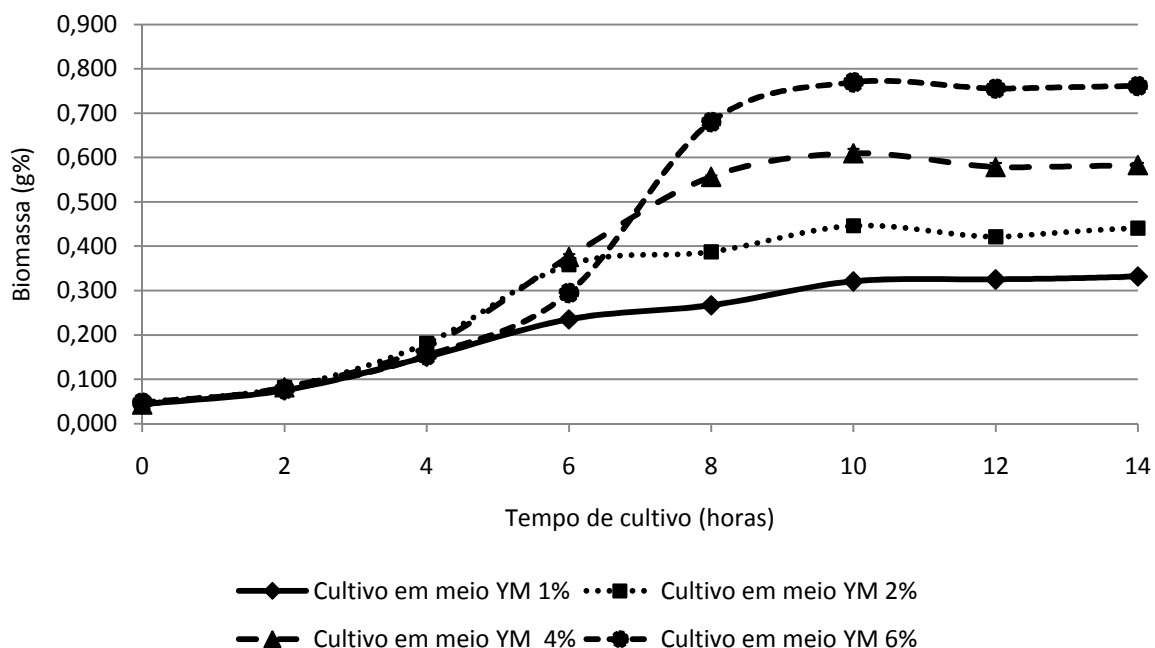
FIGURA 15 - VARIAÇÃO NA CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCAR REDUTOR EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CULTIVO DA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* EM MEIO YM SUPLEMENTADO COM 100 mg Fe l^{-1} DE SULFATO FERROSO EMPREGANDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NUTRIENTES



A Figura 15 mostra o consumo da fonte de carbono empregada nos cultivos em meio YM suplementado com 100 mg Fe l^{-1} utilizando diferentes concentrações de nutrientes. O valor de açúcar redutor no início do cultivo corresponde à concentração de glucose utilizada no meio YM e mais açúcares presentes em menor quantidade no extrato de malte, que apresenta elevadas concentrações de açúcares redutores, principalmente maltoses.

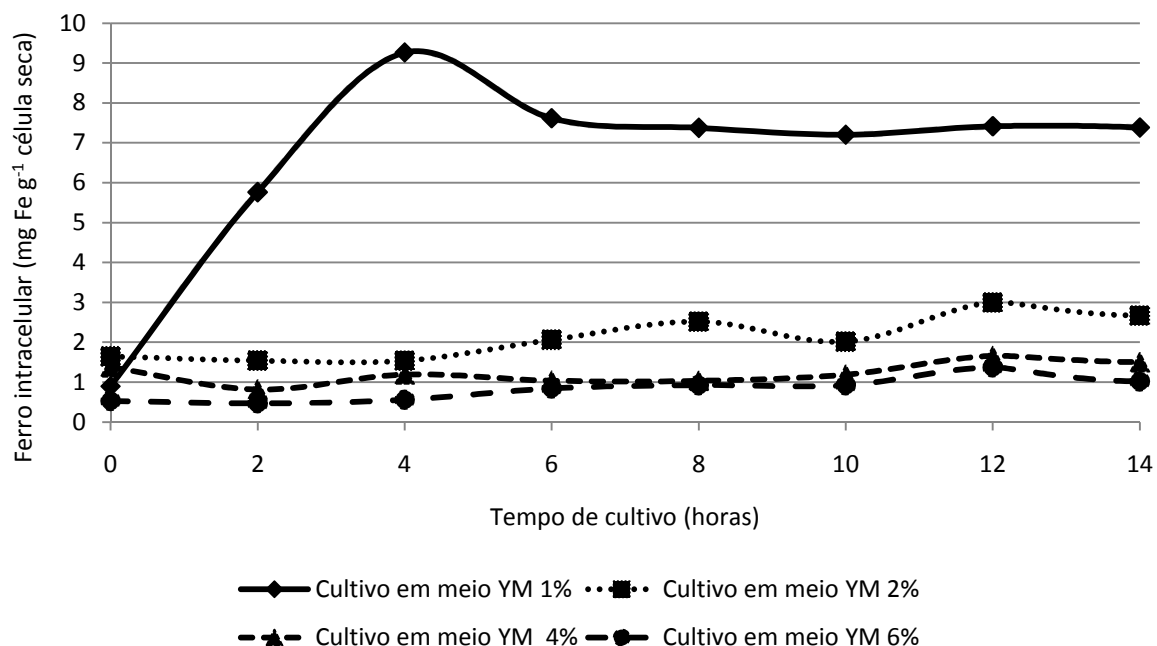
A concentração residual de açúcar redutor observada após 6 horas de cultivo foi de $0,122 \text{ g l}^{-1}$ e de $0,322 \text{ g l}^{-1}$ para os cultivos realizados empregando meio YM 1% e 2% respectivamente. No cultivo realizado empregando meio YM 4% a concentração residual de açúcar redutor de $0,616 \text{ g l}^{-1}$ foi verificada após 8 horas de cultivo. O cultivo utilizando meio YM 6% a concentração residual de açúcar redutor observada após 10 horas de cultivo foi de $0,647 \text{ g l}^{-1}$.

FIGURA 16 - FORMAÇÃO DE BIOMASSA EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CULTIVO DA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* EM MEIO YM SUPLEMENTADO COM 100 mg Fe l^{-1} DE SULFATO FERROSO EMPREGANDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NUTRIENTES



A Figura 16 demonstra que em 10 horas de cultivo – tempo em que se observa o término da fase exponencial de crescimento em todos os meios empregados – o meio YM 1% possibilitou a formação de biomassa seca de 0,321 g%, o meio YM 2%, 0,446 g%, o meio YM 4%, 0,610 g% e em meio YM 6%, 0,770 g%. Nos meios YM 4% e YM 6% a concentração celular aumentou aproximadamente 1,75 e 2,3 vezes, respectivamente, comparado a concentração celular obtida no meio YM 1%. Não houve um aumento significativo na formação de biomassa provavelmente devido ao fato de que à medida que as células se dividiram, estas formaram produtos de metabolismo que inibiram o crescimento celular (HISS, 2001).

FIGURA 17 - VARIAÇÃO NA CONCENTRAÇÃO DE FERRO INTRACELULAR EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CULTIVO DA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* EM MEIO YM SUPLEMENTADO COM 100 mg Fe l^{-1} DE SULFATO FERROSO EMPREGANDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NUTRIENTES



A Figura 17 mostra a concentração de ferro incorporado pelas células de levedura de panificação cultivadas nos meios YM 1%, 2%, 4% e 6% suplementados com 100 mg Fe l^{-1} . Ao se empregar o meio YM 1%, a quantidade de ferro intracelular foi maior, em torno de $9,265 \text{ mg Fe g}^{-1}$ célula seca em 4 horas e em 12 horas de cultivo esta concentração foi de $7,416 \text{ mg Fe g}^{-1}$ célula seca.

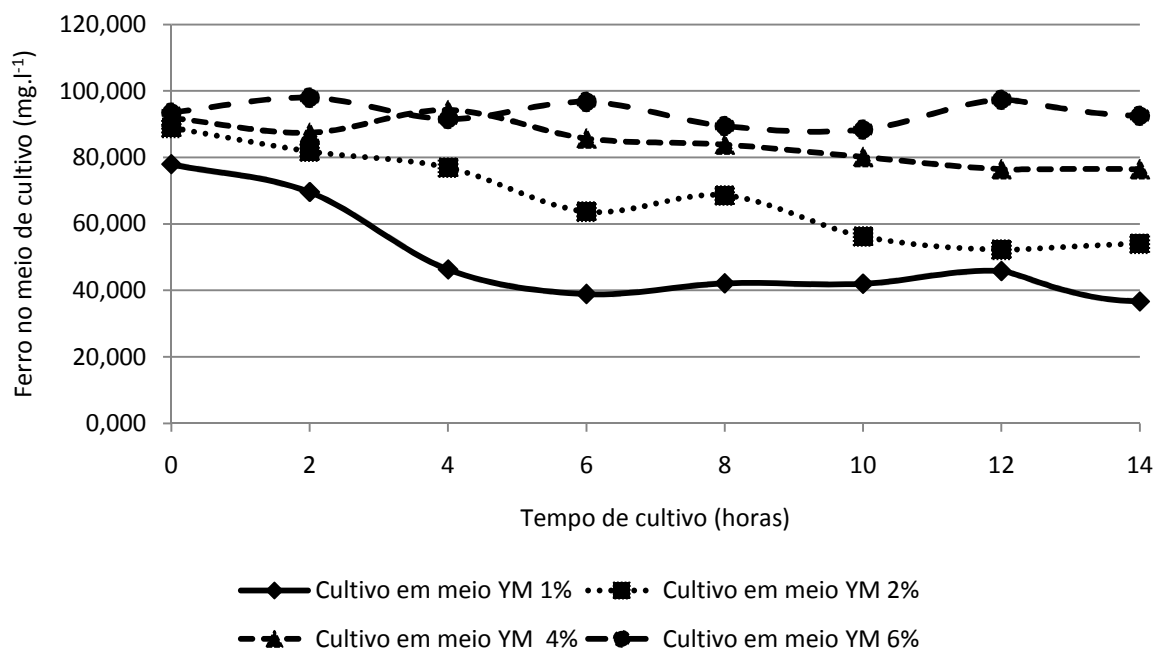
Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Stehlik-Thomas e colaboradores (2003). Neste estudo, os autores avaliaram a formação de biomassa da levedura *Saccharomyces cerevisiae* quando cultivada em meio contendo melaço de beterraba, suplementado com 800 mg Fe l^{-1} empregando cloreto férrico, em condições semi-aeróbias e anaeróbias. Os autores verificaram que a maior taxa de incorporação de ferro ocorreu nas primeiras 4 horas de cultivo, tanto para a condição semi-aeróbia quanto para a condição em anaerobiose. Após 12 horas de cultivo em condição anaeróbia, a taxa de incorporação de ferro chegou ao valor máximo, sendo de 10 mg Fe g^{-1} célula seca e após 16 horas de cultivo em condição semi-aeróbia a incorporação do ferro foi de $2,5 \text{ mg Fe g}^{-1}$ célula seca (STEHLIK-THOMAS *et al.*, 2003).

Gaudreau e colaboradores (2001) investigaram a distribuição do ferro em células frescas obtidas em comércio da levedura de panificação *Saccharomyces cerevisiae*, quando estas foram mantidas durante 1 hora, à temperatura de 25°C, em uma solução contendo 48,4 g l⁻¹ de sulfato ferroso, sob rápida agitação. Os autores verificaram que apenas 13% do ferro adicionado foram ligados ou absorvidos pelas células de leveduras. Uma fração significativa foi absorvida, uma vez que o citoplasma continha 3% do ferro adicionado. A maior parte do ferro na célula de levedura encontrava-se ligado à parede celular. Desta forma os autores concluíram que o íon ferroso encontra-se em maior concentração ligado à fração de manoproteínas na parede celular do que no interior da célula, entretanto os autores ressaltam que o tempo de contato entre as leveduras e a solução de ferro foi de apenas 1 hora. Além disso, os autores ressaltam a importância da parede celular como sendo o sítio do início da relação biológica, onde ocorre a interação entre as células e íon metálicos. Nas análises do citoplasma celular, o ferro correspondia a uma pequena fração em relação aos sólidos totais presentes nas organelas do que em relação aos sólidos totais presentes no citoplasma. Isto sugeriu aos autores que a maior parte do ferro absorvido pela levedura encontrava-se ainda livre no citoplasma (GAUDREAU, TOMPKINS e CHAMPAGNE, 2001).

Analizando os resultados encontrados por Gaudreau e colaboradores (2001) ainda pode-se considerar o fato de que as células de leveduras não estavam em meio de cultura com condições para a multiplicação celular, e sim em solução, o que pode ter contribuído para uma baixa absorção do sal, pois a absorção do ferro é um processo ativo, dependente de energia.

A produção de leveduras enriquecidas com ferro depende não somente da concentração de ferro intracelular, mas também da biomassa obtida. Usualmente, uma maior formação de biomassa é acompanhada de baixas concentrações de ferro intracelular e elevadas concentrações de ferro intracelular são acompanhadas de baixa taxa de formação de biomassa (YUAN *et al.*, 2004).

FIGURA 18 - CONCENTRAÇÃO DE FERRO RESIDUAL NOS MEIOS YM 1%, 2%, 4% E 6% SUPLEMENTADO COM 100 mg Fe l^{-1} DE SULFATO FERROSO DURANTE O CULTIVO DA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae*



A Figura 18 mostra o ferro residual presente nos meios de cultivo suplementados com 100 mg Fe l^{-1} . Nos cultivos empregando-se meio YM 1%, 2 % e 4% a quantidade de ferro residual foi cerca de 45 mg Fe l^{-1} , 50 mg Fe l^{-1} , e 75 mg Fe l^{-1} , respectivamente, após 12 horas de cultivo. A quantidade de ferro no meio permaneceu constante no cultivo empregando-se 6% de nutrientes. Estes resultados estão de acordo com a quantidade de ferro incorporado pela levedura durante os cultivos, apresentados na Figura 17.

Os resultados apresentados na Figura 18 sugerem que os nutrientes presentes no meio podem complexar o ferro, e este estar menos disponível para a célula.

No estudo de Stelik-Thomas e colaboradores (2003) a alta concentração de ferro empregada para suplementar os cultivos (800 mg Fe l^{-1}) possivelmente não foi danosa às células uma vez que os autores utilizaram o melaço de beterraba, um meio de cultivo complexo. Entretanto, a incorporação de ferro intracelular obtida pelos autores foi de 10 mg Fe g^{-1} célula seca, enquanto que, ao se empregar 100 mg Fe l^{-1} a incorporação foi de $7,416 \text{ mg Fe g}^{-1}$ célula seca empregando-se meio YM 1%.

Os resultados obtidos de formação de biomassa, concentração de açúcar redutor e incorporação de ferro pela levedura foram utilizados para determinação dos parâmetros cinéticos de produtividade em biomassa e produtividade de produto, apresentados nas Tabelas 5 e 6, respectivamente.

TABELA 5 - VALORES DE PRODUTIVIDADE EM BIOMASSA ($\text{g l}^{-1} \text{h}^{-1}$) DA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* CULTIVADA NOS MEIOS YM 1%, 2%, 4% E 6% SUPLEMENTADOS COM 100 mg Fe l^{-1}

Tempo de cultivo (h)	Meio YM 1%	Meio YM 2%	Meio YM 4%	Meio YM 6%
4	$0,0267 \pm 0,0010$	$0,0334 \pm 0,0003$	$0,0323 \pm 0,0015$	$0,0265 \pm 0,0018$
6	$0,0319 \pm 0,0012$	$0,0518 \pm 0,0008$	$0,0554 \pm 0,0012$	$0,0412 \pm 0,0013$
8	$0,0279 \pm 0,0007$	$0,0425 \pm 0,0010$	$0,0642 \pm 0,0004$	$0,0791 \pm 0,0019$
10	$0,0277 \pm 0,0003$	$0,0398 \pm 0,0006$	$0,0566 \pm 0,0010$	$0,0722 \pm 0,0009$
12	$0,0234 \pm 0,0001$	$0,0311 \pm 0,0006$	$0,0446 \pm 0,0008$	$0,0590 \pm 0,0005$
14	$0,0206 \pm 0,0003$	$0,0281 \pm 0,0003$	$0,0385 \pm 0,0004$	$0,0510 \pm 0,0006$

Os valores de produtividade em biomassa representam a velocidade média de crescimento referente ao tempo de cultivo.

Os valores de produtividade em biomassa representam a biomassa formada em determinado tempo de cultivo. Observa-se na Tabela 5 que a maior taxa de formação de biomassa ocorre em 6 horas nos cultivos empregando meio YM 1% e 2%, e em 8 horas nos cultivos empregando-se os meios YM 4% e 6%. Comparando os maiores valores de produtividade em biomassa apresentados na Tabela 5 os mesmos correspondem ao término da fase exponencial de crescimento da levedura de panificação *Saccharomyces cerevisiae*, representada na Figura 16.

TABELA 6 - VALORES DE PRODUTIVIDADE DE PRODUTO ($\text{mg Fe g}^{-1} \text{ célula seca h}^{-1}$) DA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* CULTIVADA NOS MEIOS YM 1%, 2%, 4% E 6% SUPLEMENTADOS COM 100 mg Fe l^{-1}

Tempo de cultivo (h)	Meio YM 1%	Meio YM 2%	Meio YM 4%	Meio YM 6%
4	$2,2559 \pm 0,1264$	$0,3845 \pm 0,0300$	$0,2634 \pm 0,0438$	$0,1398 \pm 0,0307$
6	$1,2702 \pm 0,0521$	$0,3439 \pm 0,0117$	$0,1727 \pm 0,0066$	$0,1406 \pm 0,0049$
8	$0,9226 \pm 0,0467$	$0,3147 \pm 0,0170$	$0,1291 \pm 0,0017$	$0,1158 \pm 0,0072$
10	$0,7082 \pm 0,0374$	$0,2017 \pm 0,0016$	$0,1187 \pm 0,0061$	$0,0922 \pm 0,0052$
12	$0,6181 \pm 0,0116$	$0,2501 \pm 0,0221$	$0,1381 \pm 0,0110$	$0,1142 \pm 0,0103$
14	$0,4441 \pm 0,0100$	$0,1909 \pm 0,0165$	$0,1071 \pm 0,0124$	$0,0662 \pm 0,0002$

Os valores de produtividade do produto representam a velocidade média de formação do produto referente ao tempo de cultivo.

Verifica-se pela Tabela 6 que os valores apresentados de formação de produto são superiores em todos os tempos quando se emprega o meio YM 1% e são menores, em todos os tempos avaliados, quando se emprega o meio YM 6%. Os valores demonstrados na Tabela 6 estão de acordo com o apresentado na Figura 17, em que se verifica que uma maior concentração de nutrientes no meio de cultivo não promoveu um aumento da incorporação de ferro pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

De acordo com os valores de produtividade em produto, o meio YM 1% suplementado com 100 mg Fe l⁻¹ empregando sulfato ferroso, proporcionou o melhor desempenho da levedura de panificação *Saccharomyces cerevisiae* na incorporação de ferro.

5.3 AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS MICROSCÓPICAS

Com o objetivo de visualizar a possível presença de precipitados dos sais de ferro empregados, bem como possíveis alterações morfológicas nas células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* obtidas a partir de cultivos em frascos em meio sem e com suplementação com sais de ferro, foram feitas visualizações por técnica a fresco destes cultivos, os resultados das características microscópicas dos cultivos estão apresentadas na Tabela 7.

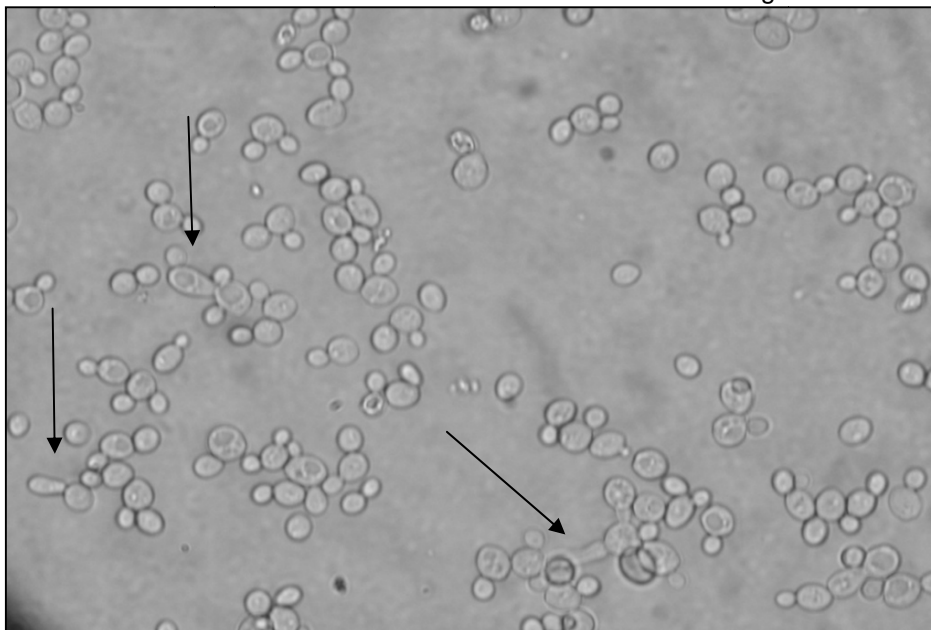
TABELA 7 - CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DE CULTIVOS REALIZADOS EMPREGANDO MEIO YM 1% SEM E COM SUPLEMENTAÇÃO DE DIFERENTES SAIS DE FERRO

Sal de ferro	Concentração (mg Fe l ⁻¹)	Precipitado	Brotamento	Pseudo-hifa
Sem suplementação		-	+++	-
Sulfato ferroso	15	-	+++	-
Sulfato ferroso	25	-	+++	+
Sulfato ferroso	50	-	+++	++
Sulfato ferroso	100	+	+++	+++
Sulfato férrico	15	++	++	+
Sulfato férrico	25	++	++	+
Cloreto ferroso	15	-	+++	++
Cloreto ferroso	25	-	+++	+++
Cloreto férrico	15	+	++	++
Cloreto férrico	25	++	++	+++
Nitrato férrico	15	++	++	-
Nitrato férrico	25	++	++	+
Citrato férrico	15	-	+++	+
Citrato férrico	25	-	+++	+
Citrato férrico	200	-	+++	++
EDTA férrico	15	+	++	+
EDTA férrico	25	+	++	+

NOTA: (-) Ausência; (+) presença discreta/leve; (++) presença moderada; (+++) presença intensa

Observa-se na Tabela 7 que alguns dos cultivos suplementados com ferro apresentam a formação de pseudo-hifa.

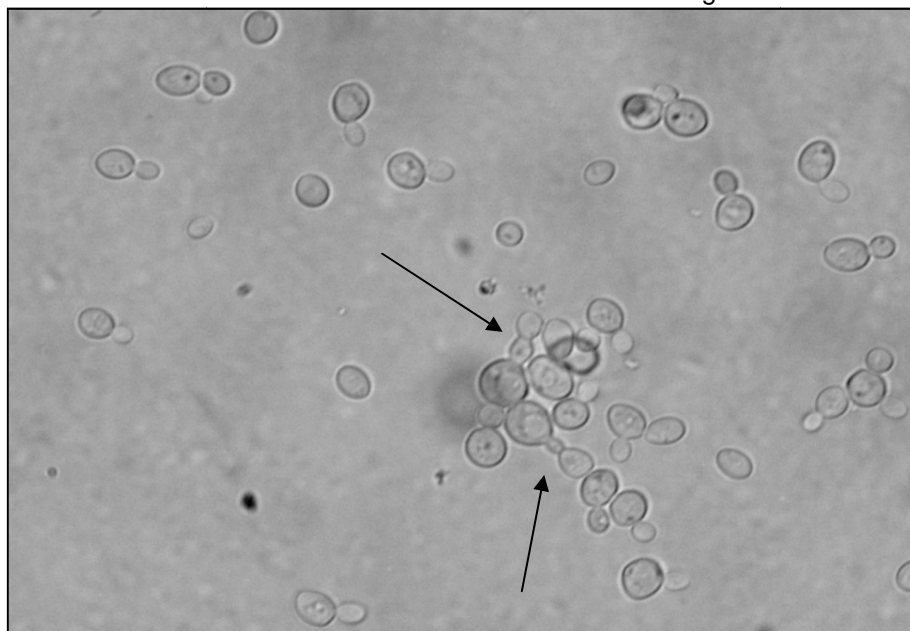
FIGURA 19 - VISUALIZAÇÃO DO CULTIVO DA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* SUPLEMENTADO COM CLORETO FERROSO 25 mg Fe l^{-1}



NOTA: Aumento de 40X. As setas indicam pseudo-hifas.

Na Figura 19 pode-se observar a formação de pseudo-hifas em um dos cultivos suplementado com cloreto ferroso 25 mg Fe l^{-1} .

FIGURA 20 - VISUALIZAÇÃO DO CULTIVO DA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* SUPLEMENTADO COM EDTA FÉRRICO 15 mg Fe l^{-1}



NOTA: Aumento de 40X. As setas indicam pseudo-hifas.

Na Figura 20 pode-se observar a formação de pseudo-hifas em um dos cultivos suplementado com EDTA férrico 15 mg Fe l^{-1} .

Usualmente as células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* crescem na forma de células globulares únicas. A habilidade desta levedura para formar pseudo-hifa perde-se na maioria das cepas selecionadas em laboratórios, que buscam células que se separem facilmente (GANCEDO, 2001).

As células na forma de pseudo-hifa possuem algumas características como: forma celular alongada, deficiência em separação celular e um padrão de brotamento unipolar (FUJITA *et al.*, 2005). As células-filhas permanecem mecanicamente conectadas com a célula-mãe por uma proteína da parede celular que persiste após a divisão, mas podem ser separadas mecanicamente. A mudança do padrão de divisão celular em micro-organismo dimórficos é modulada por fatores ambientais, tais como, disponibilidade de nutrientes (KRON, 1997). Sabe-se que células de levedura *Saccharomyces cerevisiae* quando em meio de cultivo pobre em fonte de carbono ou nitrogênio, formam pseudo-hifas, inclusive as vias de sinalização moleculares para estes eventos já estão elucidadas (ZARAGOZA e GANCEDO, 2000).

Zaragoza e Gancedo (2000) estudaram outros fatores que pudessem influenciar a morfologia celular, como cultivos em que a fonte de carbono usada foi um álcool não-metabolizável (propanolol) e cultivos com estresse osmótico resultante de concentrações de 1M de cloreto de sódio e concluíram que a formação de pseudo-hifa em cultivos de levedura *Saccharomyces cerevisiae* provavelmente é uma resposta fisiológica tanto à escassez de nutrientes no meio de cultivo quanto uma resposta a ambientes possivelmente danosos (ZARAGOZA e GANCEDO, 2000).

Algumas mudanças moleculares associadas ao crescimento em pseudo-hifa podem não estar diretamente relacionadas com outras formas de crescimento filamentoso, tais como crescimento invasivo no substrato e outros tipos de alongamento celular (LUTKENHAUS e BI, 2001).

Gancedo (2001) sugere que a formação de pseudo-hifa em resposta ao stress pode auxiliar as células a sobreviver em ambientes possivelmente danosos.

Uma ampla exploração do ambiente a um menor custo energético de formação de biomassa, aderência célula-célula, crescimento altamente polarizado promovendo invasão do substrato e uma maior razão do volume da superfície de contato dos filamentos formados que facilita o transporte de nutrientes são alguns

dos benefícios que a célula busca na forma de pseudo-hifa (CECCATO-ANTONINI, 2008).

Na Tabela 7, percebe-se que a formação de pseudo-hifa torna-se mais evidente em cultivos suplementados com sulfato ferroso nas concentrações de 50 e 100 mg Fe l⁻¹, e no cultivo suplementado com cloreto férrico na concentração de 25 mg Fe l⁻¹. Desta forma, sugere-se que elevadas concentrações de ferro, ou a presença de precipitados no meio, podem ser danosas às células de levedura *Saccharomyces cerevisiae* explicando também a menor formação de biomassa. A presença moderada de pseudo-hifa no cultivo suplementado com citrato férrico, mesmo quando se empregou a concentração de 200 mg Fe l⁻¹ sugere que este sal pode ser menos danoso às células de levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Entretanto, o motivo para que isto ocorra pode estar associado com o fato de o ânion citrato quelar o ferro e não disponibilizá-lo integralmente na concentração adicionada no meio de cultivo.

5.4 CULTIVO EM REATOR

Com o objetivo de obter células suficientes da levedura de panificação *Saccharomyces cerevisiae* para estudo da capacidade fermentativa, a levedura foi cultivada em reator de 5000 ml de capacidade, empregando meio YM 1% sem e com suplementação de 100 mg Fe l⁻¹. Foram determinados os valores de pH, biomassa, açúcares redutores, concentração de ferro intracelular e ferro extracelular no início (zero hora) e após 12 horas no término do processo.

Os cultivos sem e com suplementação de 100 mg Fe l⁻¹ iniciaram com valor de pH em torno de 4,5 e ao final do cultivo o pH dos processos estava em torno de 4,3.

Os cultivos iniciaram com uma quantidade semelhante de açúcares redutores, e ao término de 12 horas as concentrações finais de fonte de carbono foram de aproximadamente 0,125 ± 0,002 g l⁻¹, valor residual que mostra que houve consumo da fonte de carbono pelas células da levedura.

A levedura de panificação *Saccharomyces cerevisiae*, quando cultivada em reator de 5000 ml de capacidade, sem e com suplementação de sulfato ferroso,

apresentou valores semelhantes de formação de biomassa, em torno de $0,265 \pm 0,002$ g% para o cultivo realizado sem suplementação e de cerca de $0,217 \pm 0,002$ g% para o cultivo realizado com suplementação de ferro.

A levedura cultivada em meio YM 1% suplementado com 100 mg Fe l^{-1} apresentou valor de ferro intracelular de $8,062 \pm 0,251 \text{ mg Fe g}^{-1}$ célula seca ao término de cultivo, e o valor de ferro residual no sobrenadante foi $78,155 \pm 4,313 \text{ mg Fe l}^{-1}$. As determinações de ferro intracelular e de ferro residual no sobrenadante também foram realizadas para os cultivos da levedura em meio sem suplementação com ferro e não foi detectada a presença de ferro no sobrenadante e nem intracelularmente.

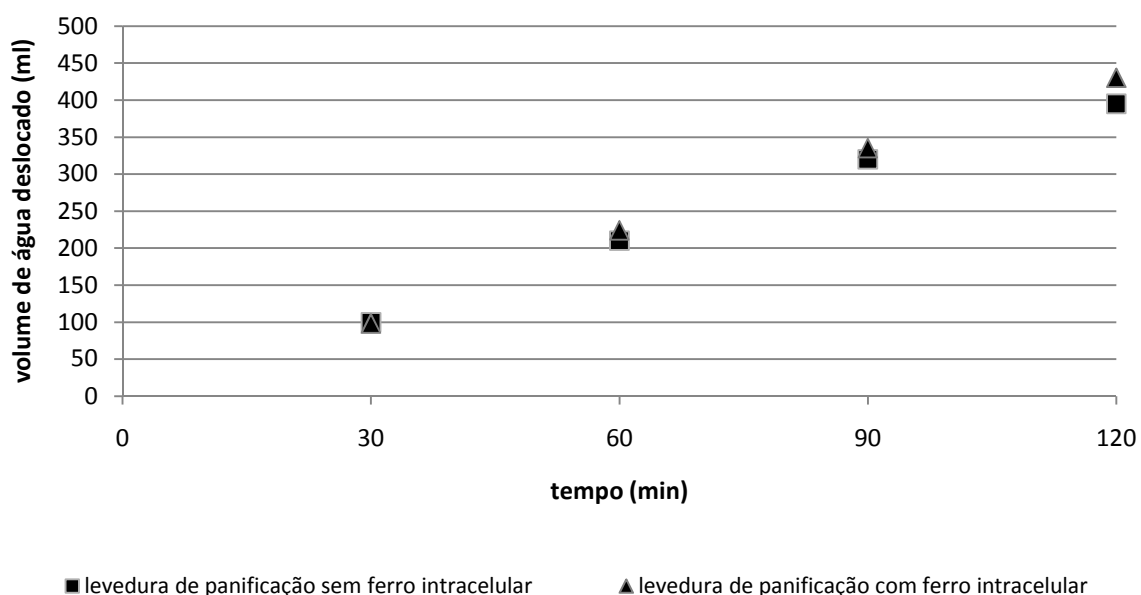
Além destas determinações, também se realizou a determinação do teor de umidade das células da levedura o qual foi em torno de 78%. Este valor foi utilizado para a conversão do teor de ferro, que é determinado em célula seca, para célula úmida, uma vez que as células úmidas foram usadas na elaboração de pães.

5.5 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE FERMENTATIVA

A capacidade fermentativa das leveduras é determinada pela sua habilidade de fermentar glucose ou maltose, pela detecção do gás produzido (STABNIKOVA *et al.*, 2008).

A capacidade fermentativa da levedura de panificação obtida no cultivo em reator foi avaliada considerando-se a atividade de glucose. O volume de água deslocado a cada 30 minutos encontra-se demonstrado na Figura 21

FIGURA 21 - AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE FERMENTATIVA DA LEVEDURA DE PANIFICAÇÃO



Representação do volume de água deslocado de um recipiente fechado (ml) devido à produção de gás carbônico pela levedura de panificação *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em meio YM 1% sem suplementação de ferro e pela levedura de panificação *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em meio YM 1% suplementado com 100 mg Fe l⁻¹. O volume de água deslocado foi avaliado a cada 30 minutos.

Observa-se pela Figura 21 que o volume de água deslocado pela levedura de panificação sem e com aumento de ferro intracelular são semelhantes nos tempos 30, 60 e 90 minutos. No tempo de 120 minutos a levedura de panificação contendo 8 mg Fe g⁻¹ célula seca deslocou 430 ml de água e a levedura de panificação sem ferro intracelular incorporado deslocou 395 ml.

O ferro, quando incorporado pela célula de levedura será transportado aos vacúolos, onde será armazenado e poderá ser utilizado pela célula (PHILPOTT e PROTCHENKO, 2008). Sugere-se que a levedura contendo ferro intracelular, após os 120 minutos de fermentação, possa ter mobilizado o ferro para utilizá-lo em funções respiratórias da célula, explicando o pequeno incremento no volume de água deslocada observado.

A capacidade fermentativa da levedura de panificação *Saccharomyces cerevisiae* com e sem ferro intracelular foi também avaliada em processo de panificação.

O teste de tempo de subida feito com a massa do pão durante o crescimento da mesma foi satisfatório nas duas amostras, sendo de 2 minutos para a levedura sem ferro intracelular e de 3 minutos para a levedura com ferro intracelular.

A capacidade da levedura com ferro intracelular em fermentar a massa de pão foi semelhante à da levedura cultivada em meio sem suplementação de ferro. O tempo de crescimento das massas foi semelhante, aproximadamente 15 minutos, nos dois intervalos em que se aguardou a massa dobrar seu volume. Os pães apresentaram formação de bolhas na massa de forma homogênea após o processo de assamento.

Considerando-se o valor de ferro intracelular de 8 mg Fe g^{-1} célula seca da levedura de panificação obtida em cultivo, o teor de 78% de umidade das células e as 38 g de levedura úmida empregadas para produzir um pão de 250 g, o valor teórico da concentração de ferro esperado para o pão produzido com as leveduras contendo ferro intracelular era de $27,3 \text{ mg Fe } 100 \text{ g}^{-1}$ pão,

Os pães elaborados foram analisados quanto ao teor de ferro utilizando a metodologia de espectrometria de absorção atômica. O pão produzido com levedura de panificação cultivada em meio YM 1% sem suplementação possuía $4,17 \text{ mg Fe } 100 \text{ g}^{-1}$ de pão (Anexo 1). O pão produzido com levedura de panificação cultivada em meio YM 1% com suplementação de 100 mg Fe l^{-1} empregando sulfato ferroso possuía $24,164 \text{ mg Fe } 100 \text{ g}^{-1}$ de pão (Anexo 2).

A legislação vigente na data de redação deste documento, recomenda o consumo diário de 14 mg Fe para adultos, 9 mg Fe para crianças de 7 a 9 anos e 27 mg Fe para gestantes (BRASIL, 2005).

Os resultados da incorporação de ferro no pão indicam que a levedura de panificação *Saccharomyces cerevisiae*, quando obtida por cultivo em meio YM 1% suplementado com 100 mg Fe l^{-1} conserva sua capacidade fermentativa e pode ser utilizada para a suplementação de ferro em produtos de panificação.

6 CONCLUSÕES

Os sais sulfato férrico, cloreto férrico e nitrato férrico precipitaram após esterilização ou na mistura com os nutrientes. O meio suplementado com EDTA férrico não promoveu a incorporação de ferro pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* e o meio com cloreto ferroso inibiu a formação de biomassa nas concentrações de 15 mg Fe l⁻¹ e 25 mg Fe l⁻¹ comparativamente aos cultivos sem adição de ferro. A concentração de biomassa nos cultivos suplementados com citrato férrico, sulfato ferroso e sem suplementação de ferro foram semelhantes. O meio com sulfato ferroso 100 mg Fe l⁻¹ permitiu maior acúmulo de ferro intracelular, em torno de 5,43 mg Fe g⁻¹ célula seca.

Nos cultivos com os sais cloreto férrico e cloreto ferroso nas concentrações de 15 mg Fe l⁻¹ e 25 mg Fe l⁻¹ e em todos os cultivos com concentrações de ferro igual ou acima de 50 mg Fe l⁻¹, foi observada a presença moderada ou intensa de pseudo-hifas.

Considerando-se os valores de produtividade em biomassa e em produto, o meio YM 1% suplementado com 100 mg Fe l⁻¹ empregando sulfato ferroso, proporcionou o melhor desempenho da levedura de panificação *Saccharomyces cerevisiae* tanto no que se refere ao crescimento celular quanto na incorporação de ferro.

A levedura de panificação *Saccharomyces cerevisiae* contendo 8 mg Fe g⁻¹ célula seca manteve sua capacidade fermentativa e pode ser utilizada em processos de panificação.

O pão produzido com a levedura de panificação cultivada em meio YM 1% suplementado com 100 mg Fe l⁻¹ empregando sulfato ferroso, obteve 24,164 mg Fe 100 g⁻¹ de pão, sendo que este teor de ferro foi seis vezes superior ao pão produzido com a levedura cultivada em meio YM 1% sem suplementação de ferro.

REFERÊNCIAS

- ARMAND-FRAPIER. Musée Armand-Frapier. Centre d'interprétation des biociences. Disponível em: <http://www.musee-afrappier.qc.ca/en/index.php?pageid=3411-html&image=3411_microscope3>. Acesso em: 14 abr 2010.
- ASKWITH, C. C.; DE SILVA, D. e KAPLAN, J. Molecular biology of iron acquisition in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Microbiol.**, v.20, n.1, p.27-34, 1996.
- BAKKER, B. M.; OVERKAMP, K. M.; MARIS, A. J. A. V.; KÖTTER, P.; LUTTIK, M. A. H.; DIJKEN, J. P. V. e PRONK, J. T. Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol. Rev.**, v.25, n.1, p.15-37, 2000.
- BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W. e YARROW, D. **Yeasts: characteristics and identification**. 3ed. Cambridge, U.K. ; New York, NY, USA: Cambridge University Press, 2000. ix, 1139 p. p.
- BLOMBERG, A. Metabolic surprises in *Saccharomyces cerevisiae* during adaptation to saline conditions: questions, some answers and a model. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.182, n.1, p.1-8, 2000.
- BRASIL. Resolução RDC 269, de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais. **Diário Oficial da União; Poder Executivo**. 2005. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>>. Acesso em: 11 mar 2010.
- BUDAVARI, S. **The Merck index : an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals**. 12ed. Whitehouse Station, NJ: Merck, 1996.
- CARVALHO, W. C. Contagem de células sanguíneas. In. **Técnicas médicas de hematologia e imuno-hematologia**. Belo Horizonte: Coopmed, 1994. p.73 - 80.
- CECCATO-ANTONINI, S. R. Biotechnological implications of filamentation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol. Lett.**, v.30, n.7, p.1151-61, 2008.
- CHANG, Y. J.; JO, M. Y.; HWANG, E. H.; PARK, C. U. e KIM, K. S. Recovery from iron deficiency in rats by the intake of recombinant yeast producing human H-ferritin. **Nutrition**, v.21, n.4, p.520-4, 2005.
- CHOJNACKA, K. Biosorption and bioaccumulation - the prospects for practical applications. **Environ. Int.**, v.36, n.3, p.299-307, 2010.
- COCATO, M. L.; RÉ, M. I.; TRINDADE NETO, M. A.; CHIEBAO, H. P. e COLLI, C. Avaliação por métodos *in vitro* e *in vivo* da biodisponibilidade de sulfato ferroso microencapsulado. **Rev. Nutr.**, v.20, n.3, p.239-247, 2007.
- COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. 1ed. Barueri, SP: Manole, 2005.

COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. 2ed. Barueri, SP: Manole, 2007.

DA SILVA, P. H. e HASHIMOTO, Y. **Interpretação laboratorial do eritrograma: texto e atlas**. São Paulo: Lovise, 1999.

DAVIS, P. A.; MCDOWELL, L. R.; WILKINSON, N. S.; BUERGELT, C. D.; VAN ALSTYNE, R.; WELDON, R. N.; MARSHALL, T. T. e MATSUDA-FUGISAKI, E. Y. Comparative effects of various dietary levels of Se as sodium selenite or Se yeast on blood, wool, and tissue Se concentrations of wether sheep. **Small Rum Res**, v.74, n.1-3, p.149-158, 2008.

DEWETTINCK, K.; VAN BOCKSTAELE, F.; KÜHNE, B.; VAN DE WALLE, D.; COURTENS, T. M. e GELLYNCK, X. Nutritional value of bread: Influence of processing, food interaction and consumer perception. **J. Cereal Sci.**, v.48, n.2, p.243-257, 2008.

DOSTALEK, P.; PATZAK, M. e MATEJKA, P. Influence os specific growth limitation on biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*. **Int. Biodeter. Biodegrad.**, v.54, n.1-2, p.203-207, 2004.

FELDMANN, H. Yeast molecular biology: a short compendium on basic features and novel aspects. Disponível em: <http://biochemie.web.med.uni-muenchen.de/Yeast_Biol/>. Acesso em: 20 ago 2008.

FERREIRA, E. M. D. F. C. **Identificação e controlo adaptativo de processos biotecnológicos**. 1995. 295 p. Dissertação para Doutoramento em Engenharia Química (Doutoramento em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade do Porto, Lisboa, 1995.

FUJITA, A.; HIROKO, T.; HIROKO, F. e OKA, C. Enhancement of superficial pseudohyphal growth by overexpression of the SFG1 gene in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Gene**, v.363, p.97-104, 2005.

GANCEDO, J. M. Control of pseudohyphae formation in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol. Rev.**, v.25, n.1, p.107-23, 2001.

GAUDREAU, H.; TOMPKINS, T. A. e CHAMPAGNE, C. P. The distribution of iron in iron-enriched cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **Acta Aliment.**, v.30, n.4, p.355-361, 2001.

GLIGIC, L.; PALIC, T. e NIKOLOVSKI, J. The beneficial effects of iron-enriched yeast *Saccharomyces cerevisiae* biomass in poultry breeding. **Folia Veterinaria**, v.48, n.2, p.104-107, 2004.

GRIFFIN, D. H. **Fungal physiology**. 2ed. New York: Wiley-Liss, 1994. 458 p. p.

HASSETT, R. F.; ROMEO, A. M. e KOSMAN, D. J. Regulation of high affinity iron uptake in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Role of dioxygen and Fe. **J. Biol. Chem.**, v.273, n.13, p.7628-36, 1998.

HISS, H. **Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 2001. 541 p.

JENNINGS, M. L. e CUI, J. Chloride homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*: high affinity influx, V-ATPase-dependent sequestration, and identification of a candidate Cl⁻ sensor. **J. Gen. Physiol.**, v.131, n.4, p.379-91, 2008.

JOSHI, V. K. e PANDEY, A. **Biotechnology: food fermentation: microbiology, biochemistry, and technology**. New Delhi: Educational Publishers & Distributors : Exclusive distributors, Asiatech Publishers Inc., 1999. 2 v. (1372) p. p.

KOHJIN CO LTD. KAZUHIRO, H. e JUNICHI, I. **Production of iron-containing yeast**, JP11103853, 20 abr 1999. Disponível em: <<http://www.ipo.gov.uk/>>. Acesso em: 03 mar 2010

KRISTENSEN, M. B.; TETENS, I.; JØRGENSEN, A. B. A.; DAL THOMSEN, A.; MILMAN, N.; HELS, O.; SANDSTRÖM, B. e HANSEN, M. A decrease in iron status in young healthy women after long-term daily consumption of the recommended intake of fibre-rich wheat bread. **Eur. J. Nutr.**, v.44, p.334–340, 2005.

KRON, S. J. Filamentous growth in budding yeast. **Trends Microbiol**, v.5, n.11, p.450-4, 1997.

KWOK, E. Y.; STOJ, C. S.; SEVERANCE, S. e KOSMAN, D. J. An engineered bifunctional high affinity iron uptake protein in the yeast plasma membrane. **J. Inorg. Biochem.**, v.100, n.5-6, p.1053-60, 2006.

LETAVAYOVA, L.; VLASAKOVA, D.; SPALLHOLZ, J. E.; BROZMANOVA, J. e CHOVANEC, M. Toxicity and mutagenicity of selenium compounds in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mutat. Res.**, v.638, n.1-2, p.1-10, 2008.

LUTKENHAUS, J. e BI, E. Cell morphogenesis and division. **Curr. Opin. Microbiol.**, v.4, n.6, p.621-624, 2001.

MARTINDALE, W. e REYNOLDS, J. E. F. **The extra pharmacopoeia**. 29ed. London: Pharmaceutical Press, 1989. 1896 p. p.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.**, v.31, n.3, p.426-428, 1959.

MRVCIC, J.; STANZER, D.; STEHLIK-TOMAS, V.; SKEVIN, D. e GRBA, S. Optimization of bioprocess for production of copper-enriched biomass of industrially important microorganism *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biosci. Bioeng.**, v.103, n.4, p.331-7, 2007.

NIELSEN, M. K. e ARNEBORG, N. The effect of citric acid and pH on growth and metabolism of anaerobic *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii* cultures. **Food Microbiol.**, v.24, n.1, p.101-5, 2007.

PALLAORO, H. T. M. **Nutrição molecular: melhorando a qualidade de vida.** Petrópolis: Vozes, 1998.

PAS, M.; PISKUR, B.; SUSTARIC, M. e RASPOR, P. Iron enriched yeast biomass - a promising mineral feed supplement. **Bioresour. Technol.**, v.98, n.8, p.1622-8, 2007.

PHILPOTT, C. C. e PROTCHENKO, O. Response to iron deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Eukaryot. Cell**, v.7, n.1, p.20-7, 2008.

REILLY, C. **Metal contamination of food.** 2ed. London; New York: Elsevier Applied Science, 1991. 284 p. p.

ROSA, C. e GÁBOR, P. **Biodiversity and ecophysiology of yeasts.** Berlin ; London: Springer, 2006. 579 p. p. (The yeast handbook).

RUSSEL, J. B. **Química Geral.** 2ed. São Paulo: Makron Books, 1994.

SCHRODER, I.; JOHNSON, E. e DE VRIES, S. Microbial ferric iron reductases. **FEMS Microbiol. Rev.**, v.27, n.2-3, p.427-47, 2003.

SGARBIERI, V. C.; ALVIM, I. D.; VILELA, E. S. D.; BALDINI, V. L. S. e BRAGAGNOLO, N. Produção piloto de derivados de levedura (*Saccharomyces sp.*) para uso como ingrediente na formulação de alimentos. **Braz. J. of Food Technol.**, v.2, n.1,2, p.119-125, 1999.

SHOEIB, T. e MESTER, Z. Towards the characterization of metal binding proteins in metal enriched yeast. **Microchem. J.**, v.85, n.2, p.329-340, 2007.

JAPAN TOBACCO INC. SHUSUKE, S.; TOSHINOBU, S. e FUNIHIDE, Y. **Production method of iron yeast**, JP2006238878 (A) 19 set 2006. Disponível em: <<http://www.ipo.gov.uk/>>. Acesso em: 03 mar 2010

STABNIKOVA, O.; IVANOV, V.; LARIONOVA, I.; STABNIKOV, V.; BRYSEWSKA, M. A. e LEWIS, J. Ukrainian dietary bakery products with selenium-enriched yeast. **LWT**, v.41, n.5, p.890-895, 2008.

STEHLIK-THOMAS, V.; GRBA, S.; STANZER, D.; VAHCIC, N. e ZETIC, V. G. Uptake of iron by yeast cells and its impact on biomass production. **Acta Aliment.**, v.32, n.3, p.279-287, 2003.

SUHAJDA, A.; HEGOCZKI, J.; JANZSO, B.; PAIS, I. e VERECZKEY, G. Preparation of selenium yeasts I. Preparation of selenium-enriched *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Trace. Elem. Med. Biol.**, v.14, n.1, p.43-7, 2000.

TAMARIT, J.; IRAZUSTA, V.; MORENO-CERMENO, A. e ROS, J. Colorimetric assay for the quantitation of iron in yeast. **Anal. Biochem.**, v.351, n.1, p.149-51, 2006.

UFPR. **Bioquímica: aulas práticas**. 6ed. Curitiba: Editora da UFPR, 2001. 178 p.

VARGA, E. e MARÁZ, A. Yeast cells as sources of essential microelements and vitamins B1 and B2. **Acta Aliment.**, v.31, n.4, p.393-405, 2002.

WALTER, F. G. **The manufacture of compressed yeast**. 2ed. London,: Chapman & Hall, 1953. 317 p. p.

WHEELER, R. Haemoglobin. Disponível em:
<http://en.wikipedia.org/wiki/File:1GZX_Haemoglobin.png>. Acesso em: 27 abr 2010.

WHO. Vitamin and mineral requirements in human nutrition. **World Health Organization; FAO**. Geneva Rome2004. Disponível em:
<<http://whqlibdoc.who.int/publications/2004/9241546123.pdf>>. Acesso em: 22 abr 2008.

WHO. Vitamin and Mineral Nutrition Information System (VMNIS) - Global database on anaemia. **World Health Organization**. 2007. Disponível em:
<http://who.int/vmnis/anaemia/data/database/countries/bra_ida.pdf>. Acesso em: 04 maio 2008.

WINDE, J. H. D. **Functional genetics of industrial yeasts**. Berlin ; New York: Springer, 2003. xiv, 367 p. p. (Topics in current genetics; 2).

YAMADA, E. A. e SGARBIERI, V. C. Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) protein concentrate: preparation, chemical composition, and nutritional and functional properties. **J. Agric. Food Chem.**, v.53, n.10, p.3931-6, 2005.

YIN, H.; CHEN, Z.; GU, Z. e HAN, Y. Optimization of natural fermentative medium for selenium-enriched yeast by D-optimal mixture design. **LWT - Food Science and Technol.**, v.42, p.327-331, 2009.

YUAN, Y.; GUO, X.; HE, X.; ZHANG, B. e LIU, S. Construction of a high-biomass, iron-enriched yeast strain and study on distribution of iron in the cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol. Lett.**, v.26, n.4, p.311-5, 2004.

ZAMORA, A. Chemical structure of vitamins and minerals. Disponível em:
<<http://www.scientificpsychic.com/health/vitamins.html>>. Acesso em: 14 jul 2008.

ZARAGOZA, O. e GANCEDO, J. M. Pseudohyphal growth is induced in *Saccharomyces cerevisiae* by a combination of stress and cAMP signalling. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.78, n.2, p.187-94, 2000.

ANEXOS

ANEXO 1: RESULTADO DO TEOR DE FERRO NO PÃO PRODUZIDO COM LEVEDURA CULTIVADA EM MEIO YM 1% SEM SUPLEMENTAÇÃO

 <p align="center">UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ SETOR DE TECNOLOGIA CEPPA - CENTRO DE PESQUISA E PROCESSAMENTO DE ALIMENTOS CENTRO POLITECNICO - PRÉDIO DAS USINAS PILOTO - BLOCO B - SALA 9901 CX. P. 19.063 - FONES: (41) 3366-3666 / 3361-3195 - FAX: (41) 3366-1647 e-mail: ceppa@ufpr.br - www.ceppa.ufpr.br - CEP 81531-990 - CURITIBA - PARANÁ</p>	
<p align="center">CERTIFICADO DE ANÁLISE Nº 121364</p>	
<p>PRODUTO: PÃO PRODUZIDO COM LEVEDURA DE PANIFICAÇÃO SEM INCORPORAÇÃO DE FERRO – CONTROLE – AMOSTRA 01 FABRICANTE/PRODUTOR: Fernanda Gaensly SOLICITANTE: Fernanda Gaensly</p>	
<p>PROTOCOLO DE RECEPÇÃO DE AMOSTRA Nº: 1808 – 27/11/09 AMOSTRA: 5216/09</p>	
RESULTADOS	
01/01	
<p>Descrição do produto: amostra recebida sob temperatura ambiente, acondicionada em 01 saco plástico transparente com peso aproximado de 148 g.</p>	
PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS	
Ferro (mg/100 g)	4,17
<p>METODOLOGIA: AOAC Official Methods of Analysis of AOAC International 18th edition, 2005, Chapter 9 p. 16-22, Method 999.10.</p>	
<p>Dados do ensaio: Início: 03/12/09 Término: 04/12/09 Responsáveis: Andréa B. Gonçalves Bonassoli e Louise Caetano</p>	
 Emília Borges Gerente Técnica CRQ 09100126	 Jackeline Taveira Cangussu Coordenadora do Laboratório CRQ 09200768 – 9ª Região
Curitiba, 10 de Dezembro de 2009	
<p>OBSERVAÇÃO: - A PRESENTE ANÁLISE TEM SEU VALOR RESTRITO A AMOSTRA RECEBIDA PELO CEPPA. - AS INFORMAÇÕES CONSTANTES NESTE CERTIFICADO DE ANÁLISE SÃO CONFIDENCIAIS E PERTENCENTES AO SOLICITANTE. - É PERMITIDA A REPRODUÇÃO, DESDE QUE INTEGRALMENTE E SEM NENHUMA ALTERAÇÃO.</p>	

ANEXO 2: RESULTADO DO TEOR DE FERRO NO PÃO PRODUZIDO COM LEVEDURA CULTIVADA EM MEIO YM 1% SUPLEMENTADO COM FERRO

 <p align="center">UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ SETOR DE TECNOLOGIA CEPPA - CENTRO DE PESQUISA E PROCESSAMENTO DE ALIMENTOS CENTRO POLITECNICO - PRÉDIO DAS USINAS PILOTO - BLOCO B - SALA 3901 CX. P. 19.083 - FONES: (41) 3366-3666 / 3361-3199 - FAX: (41) 3366-1647 e-mail: ceppa@ufpr.br - www.ceppa.ufpr.br - CEP 81531-980 - CURITIBA - PARANÁ</p>			
<p align="center">CERTIFICADO DE ANÁLISE Nº 121367</p>			
<p>PRODUTO: PÃO PRODUZIDO COM LEVEDURA DE PANIFICAÇÃO COM INCORPORAÇÃO DE FERRO - AMOSTRA 02 FABRICANTE/PRODUTOR: Fernanda Gaensly SOLICITANTE: Fernanda Gaensly</p>			
<p>PROTOCOLO DE RECEPÇÃO DE AMOSTRA Nº: 1808 - 27/11/09 AMOSTRA: 5217/09</p>			
RESULTADOS			
01/01			
<p>Descrição do produto: amostra recebida sob temperatura ambiente, acondicionada em 01 saco plástico transparente com peso aproximado de 178 g.</p>			
PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS			
<table border="1"> <tr> <td>Ferro (mg/100 g)</td> <td>24,64</td> </tr> </table>	Ferro (mg/100 g)	24,64	
Ferro (mg/100 g)	24,64		
<p>METODOLOGIA: AOAC Official Methods of Analysis of AOAC International [8^a edição, 2005, Chapter 7 p. 16-22, Method 991.15]</p> <p>Dados do ensaio: Início: 03/12/09 Término: 04/12/09 Responsáveis: Andréa B. Gonçalves Rosasoli e Louise Cartano</p>			
 Emília Borges Gerente Técnica CRQ 09100126	 Jackeline Taveira Cangussu Coordenadora do Laboratório CRQ 09200768 - 9ª Região		
Curitiba, 10 de Dezembro de 2009			
<p>OBSERVAÇÃO: - A PRESENTE ANÁLISE TEM SEU VALOR RESTRITO A AMOSTRA RECEBIDA PELO CEPPA. - AS INFORMAÇÕES CONSTANTES NESTE CERTIFICADO DE ANÁLISE SÃO CONFIDENCIAIS E PERTENCENTES AO SOLICITANTE. - É PERMITIDA A REPRODUÇÃO, DESDE QUE INTEGRALMENTE E SEM NENHUMA ALTERAÇÃO.</p>			